



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

LUCAS LEITE LINO NÓBREGA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
TNFA (-308 G/A) E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UMA AMOSTRA
BRASILEIRA**

Brasília

2016

LUCAS LEITE LINO NÓBREGA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
TNFA (-308 G/A) E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UMA AMOSTRA
BRASILEIRA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Ceilândia, da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para obtenção do
grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Co-orientadora: Dr.^a Vivian Taís Fernandes Cipriano

Brasília

2016

LUCAS LEITE LINO NÓBREGA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
TNFA (-308 G/A) E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UMA AMOSTRA
BRASILEIRA**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/Universidade de Brasília)

Profa. Dr.^a Calliandra Maria de Souza Silva
(UnB)

Prof. Me. Daniel Oliveira Freire
(UniCeub)

Brasília

2016

Dedico este trabalho a Deus, por ter me abençoado com o apoio incondicional da minha família e amigos durante esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, por ter me concedido saúde para alcançar meus objetivos.

A minha mãe por não ter medido esforços para que eu pudesse me dedicar aos estudos e ao meu pai por ter me ensinado o caminho do constante aprendizado.

A professora Izabel por sua disponibilidade e valiosas orientações, que tornaram a concretização desse trabalho possível. Agradeço, também, pelo exemplo profissional que representou para minha formação acadêmica.

Aos meus amigos agradeço por terem feito parte dos momentos de dificuldade e de alegria durante a graduação e por enriquecerem todo esse processo.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos Drs. Luzitano Ferreira e Carlos Lins pelas amostras dos pacientes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo na região promotora do gene TNFA (-308 G/A) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES).....	17
Tabela 2 - Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene TNFA (-308 G/A) em pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico (LES) conforme os critérios ACR.	18
Tabela 3 - Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene TNFA (-308 G/A) em pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico (LES) conforme características clínicas relacionadas com o critério ACR Serosites.	18
Tabela 4 - Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene TNFA (-308 G/A) em pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico (LES) conforme o resultado dos Exames imunológicos.	19
Tabela 5 - Distribuição do genótipo GG da região promotora do gene TNFA (-308) em pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico (LES) conforme o grupo étnico/país citado na literatura.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina

G – Guanina

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

SNP – *Single nucleotide polymorphism*

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

μl - Microlitro

P – p-valor

PCR – Reação em cadeia da polimerase

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

χ^2 – qui-quadrado

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

IC OR – Intervalo de Confiança para a *Odds Ratio*

OR – *Odds Ratio*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos Específicos	12
3	JUSTIFICATIVA.....	13
4	MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1	Participantes da pesquisa	14
4.2	Extração de DNA	14
4.3	PCR (Reação em cadeia de Polimerase) Qualitativo.....	15
4.4	Digestão enzimática.....	16
4.5	Análise Estatística.....	16
5	RESULTADOS	17
6	DISCUSSÃO.....	20
7	CONCLUSÃO.....	24
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
	ANEXO.....	27

RESUMO

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune caracterizada pela perda da tolerância imunológica e amplo espectro de manifestações clínicas. Estudos têm observado associação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na região promotora do gene TNFA -308 (rs1800629) como fator de risco para LES em diferentes grupos étnicos, pela alteração da expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), citocina pivotal para entendimento da etiopatogenia do LES. Para investigar a possível associação entre o polimorfismo na região promotora do gene TNFA na posição -308 G/A com susceptibilidade para LES e suas manifestações clínicas, foi realizado um estudo descritivo envolvendo 207 casos de LES em pacientes brasileiros. Para a genotipagem desta região foi utilizada a técnica PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism -polymerase chain reaction*). A frequência do genótipo GG na amostra estudada foi de 59,9%. Este genótipo é fator protetor em LES para manifestação de Serosites - ACR (P <0,001; OR = 0,31) e Alterações Imunológicas - ACR (P = 0,026; OR = 0,51) e também foi observada associação significativa com Pleurisia (P = 0,008; OR = 0,38); Pericardite (P <0,001; OR = 0,04); Derrame Pleural (P = 0,015; OR = 0,45) e Anti-dsDNA – Alterado (P = 0,039; OR = 0,55). No entanto, este genótipo apresentou-se como fator de risco para Hipertensão Arterial (P <0,001; OR = 3,34) e Vasculite (P <0,001; OR = 2,88) nesta população. Estes achados corroboram com associação do genótipo GG para serosites em outra amostra da população brasileira estudada.

Palavras-chave: TNFA, polimorfismo, lúpus, TNFA-308(G/A)

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by loss of immunological tolerance and broad spectrum of clinical manifestations. Studies has observed association of single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of the gene TNFA -308 (rs1800629) as a risk factor for SLE in different ethnic groups, by changing the tumor necrosis factor alpha expression (TNF- α), cytokine pivotal to understanding the pathogenesis of SLE. To investigate the possible association between the polymorphism in the promoter region of the gene TNFA at position -308 G/A with susceptibility to SLE and clinical manifestations, was performed a descriptive study involving 207 cases of SLE in Brazilian patients. For genotyping of this region was used to PCR-RFLP technique (restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction). The frequency of GG genotype in the sample was 59,9%. This genotype is protective factor in SLE for manifestation of Serositis – ACR (P <0.001; OR = 0.31) and Immunologic disorders – ACR (P = 0.026; OR = 0.51) and was also observed a significant association with Pleurisy (P = 0.008; OR = 0.38); Pericarditis (P <0.001; OR = 0.04); Pleural effusion (P = 0.015; OR = 0.45) and Anti-dsDNA – changed (P = 0.039; OR = 0.55). However, this genotype was presented as a risk factor for Arterial hypertension (P <0.001; OR = 3.34) and Vasculitis (P <0.001; OR = 2.88) in this population. These findings corroborate the GG genotype association for Serositis in another sample of the Brazilian population studied.

Keywords: TNFA, polymorphism, lupus, TNFA-308(G/A)

1 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença crônica autoimune que exibe amplo espectro de manifestações clínicas envolvendo múltiplos órgãos e sistemas (GLESSE et al., 2014). É caracterizada pela perda da autotolerância aos antígenos próprios, produção de auto-anticorpos e deposição de imunocomplexos em órgãos e tecidos que resultam em processos inflamatórios crônicos (GHODKE-PURANIK; NIEWOLD, 2015).

Embora a exata etiologia do LES ainda não esteja completamente elucidada, acredita-se que há um fundo genético subjacente e genes associados à sua predisposição (GHEITA et al., 2015; LIN et al., 2010). O extenso estudo do genoma humano aumentou substancialmente a quantidade de genes candidatos associados à LES (CRISPÍN et al., 2010).

Dentre os fatores determinantes na patogênese do LES, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tem sido investigado. O gene TNFA localiza-se no braço curto do cromossomo 6 na posição 6p.21, e está envolvido em processos inflamatórios (GOLSHANI et al., 2015). Esse gene codifica uma potente citocina pleiotrópica que desempenha papel na iniciação e propagação de respostas imunes e inflamatórias, por meio do aumento da expressão de moléculas de adesão, ativação de leucócitos, estimulação da produção de citocinas, ativação de células T e aumento na produção de anticorpos (TAHGHIGHI et al., 2015).

Entre os diversos polimorfismos descritos na região promotora do gene TNFA, na variação genética na posição -308 (G/A), foi observada alteração funcional na atividade transcricional do gene, com maior atividade na presença do alelo mutante -308A quando comparado ao -308G (SUÁREZ et al., 2005). Níveis aumentados de TNF- α sérico são observados em pacientes que se encontram na fase ativa do LES, principalmente para aqueles acometidos por nefrite lúpica (SANTOS et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi descrever a presença do polimorfismo da região promotora do gene TNFA -308 G/A (rs1800629) em uma amostra de indivíduos da população brasileira portadora de LES e investigar sua associação com a ocorrência da doença.

2.2 Objetivos Específicos

- a)** Identificar a frequência do polimorfismo da região promotora do gene TNFA (-308 G/A), cromossomo 6, posição 6p.21, em pacientes com LES atendidos por um hospital do Distrito Federal, Brasil;
- b)** Investigar se o polimorfismo na região promotora do gene TNFA está associado com a susceptibilidade à patologia auto-imune LES e suas características clínicas.

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que os fatores genéticos estão intimamente relacionados ao desencadeamento e progressão do LES e que o polimorfismo da região promotora do gene TNFA -308 G/A (rs1800629) está implicado como fator de risco genético para lúpus eritematoso sistêmico em diferentes grupos étnicos, a investigação de possíveis associações entre este polimorfismo e susceptibilidade para o desenvolvimento de LES, assim como identificação de associações com as manifestações clínicas da doença, podem contribuir para o melhor entendimento da etiopatogenia da doença e melhor prognóstico para pacientes afetados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Participantes da pesquisa

O estudo foi conduzido com 207 participantes, sendo todos pacientes diagnosticados como portadores de LES (207 mulheres, entre 18 e 76 anos, idade de 37 ± 12 anos). Estas pacientes portadoras de LES foram recrutadas em uma unidade hospitalar do Distrito Federal. As participantes selecionadas preencheram os critérios de classificação revisados e modificados pelo *American College of Rheumatology* (ACR), em 1982 (TAN et al., 1982) e 1997 (HOCHBERG, 1997).

As características clínicas de cada paciente com LES foram avaliadas cuidadosamente a partir dos respectivos prontuários. Comprometimento renal, perfil de auto-anticorpos, e ademais características clínicas também foram registradas. O comprometimento renal foi definido como proteinúria considerada maior que 0,5g/24 horas ou comprovada por biópsia de nefrite lúpica. Foram utilizados os altos índices para o título de anti-dsDNA e reduzidos para o nível C3. Para cada paciente foram determinados o número de critérios do ACR, o índice de *SLE Disease Activity* (SLEDAI) e o Lúpus Internacional de Colaboração Clínicas (SLICC) / Índice de Danos ACR.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da FEPECS (ANEXO 1).

4.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit *Invisorb Spin Blood Mini Kit* (250) da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A concentração de DNA foi determinada em corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/ μ L.

4.3 PCR (Reação em cadeia de Polimerase) Qualitativo

A PCR é um método baseado na habilidade da enzima DNA polimerase em sintetizar novas cadeias de DNA complementar a uma cadeia molde. Este quesito permite delinear uma região específica da sequência do molde que se pretende amplificar. Ao final da reação de PCR, a sequência específica é replicada em milhões de cópias.

As sequências de oligonucleotídeos utilizadas neste trabalho foram (fabricante: IDT Technologies®):

Senso 5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT -3'

Antisenso 5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG -3'

Este par de oligonucleotídeos flanqueia a região promotora do gene TNFA, no qual ocorre uma troca do nucleotídeo G por A (rs1800629). A presença do alelo A no nucleotídeo -308 aumenta a transcrição do gene do TNF- α em aproximadamente duas vezes, elevando a produção desta citocina (ABRAHAM; KROEGER, 1999).

As condições de termociclagem foram: 94°C por 12 minutos (desnaturação inicial), seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos e resfriamento por 4 minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador Life Express Thermal Cyclor TC-96/G/H(b).

Em cada reação, foram utilizados 4,0 μ L de DNA genômico na concentração de 2,5 ng/ μ L; 2,5 μ L de tampão 10x (10 mM de Tris e 50 mM de KCl); 0,75 μ L de MgCl₂ (Ludwig Biotech®), 2 μ L de dNTPs (2,5mM; Ludwig Biotech ®); 0,4 μ L de Taq-Polimerase (Ludwig Biotech®, 5U/ μ L), 1 μ L de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (IDT®, 10 pM); completando com água Milli-Q para um volume final de 25 μ L por reação. O fragmento resultante dessa PCR era constituído por 107 pb.

4.4 Digestão enzimática

O produto da PCR (fragmento, 107pb) foi digerido com a enzima NcoI (Jena Bioscience®). O alelo 1 (G) cria um novo sítio de restrição, e o fragmento de 107pb é clivado em dois de 87pb e 20pb (não visualizado no gel); o alelo 2 (A) não é clivado pela enzima, e assim, o polimorfismo foi dividido em genótipo de clivagem (GG), heterozigoto (AG) e genótipo de não clivagem (AA). Para montagem do sistema de digestão foram utilizados: 10,0 µL da PCR; 5µL de tampão 10x UB; 1 µL de enzima NcoI (10U/µL), completando com água Milli-Q para um volume final de 50 µL por reação. O sistema foi mantido a 37°C por 3 horas.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 3%, com brometo de etídio 0,1% em uma potência de 100W por 20 minutos.

4.5 Análise Estatística

As frequências genotípica e alélica dos pacientes foram descritas em termos de frequências absolutas e relativas (em porcentagem). Para associação das características clínicas para cada genótipo foi aplicado o teste qui-quadrado e o nível de significância adotado foi de 5%. Foi calculado o *Odds ratio* (OR) das frequências alélicas e genotípicas e utilizado intervalo de confiança (IC) de 95%. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

5 RESULTADOS

Os dados obtidos no presente estudo sugerem uma associação do SNP da região promotora do gene TNFA (-308 G/A) com as manifestações clínicas em pacientes com LES em amostra brasileira. Na amostra estudada, 59,9% (n =124) das pacientes eram portadoras do genótipo homozigoto dominante GG (tabela 1) o qual demonstrou ser fator protetor para Serosites - ACR (P <0,001; OR = 0,31) e Alterações Imunológicas – ACR (P = 0,026; OR = 0,51) em pacientes com LES, conforme descrito na tabela 2. Os demais critérios ACR parecem não estar relacionados com alterações genótípicas nesta região promotora do gene TNFA estudada.

A partir desses resultados, foram analisadas quais características clínicas dentro do critério ACR Serosites (tabela 3) e Alterações imunológicas (tabela 4) estavam relacionadas com a presença do polimorfismo na região -308 do gene TNFA. Observou-se que os seguintes quadros clínicos apresentavam associação estatística com o genótipo GG (sendo este genótipo, fator protetor): Pleurisia (P = 0,008; OR = 0,38); Pericardite (P <0,001; OR = 0,04); Derrame Pleural (P = 0,015; OR = 0,45) e Anti-dsDNA – Alterado (P = 0,039; OR = 0,55). No entanto, este genótipo apresentou-se como fator risco para Hipertensão Arterial (P <0,001; OR = 3,34) e Vasculite (P <0,001; OR = 2,88).

Tabela 1 – Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo na região promotora do gene TNFA (-308 G/A) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES).

TNFA -308 G→A	N	%
Genótipo		
GG	124	59,9%
GA	77	37,2%
AA	6	2,9%
GG+AA	130	62,8%
GA+AA	83	40,1%
Alelos		
G	325	78,50%
A	89	21,50%

Tabela 2 - Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene TNFA (-308 G/A) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) conforme os critérios ACR.

Critérios ACR	TFNA -308 G/A							
		GG		GA/AA		P	OR	IC
		N	%	N	%			
ARTRITE NÃO EROSIVA – ACR	SIM	114	61,0%	73	39,0%	0,342	1,56	0,62-3,94
RASH MALAR – ACR	SIM	62	59,0%	43	41,0%	0,799	0,93	0,53-1,62
LESÕES DISCOIDES – ACR	SIM	21	72,4%	8	27,6%	0,138	1,91	0,80-4,55
FOTOSENSIBILIDADE – ACR	SIM	74	59,7%	50	40,3%	0,935	0,98	0,55-1,72
SEROSITES – ACR	SIM	29	41,4%	41	58,6%	<0,001	0,31	0,17-0,57
NEFRITES – ACR	SIM	69	62,7%	41	37,3%	0,377	1,28	0,74-2,24
HEMATOLÓGICO – ACR	SIM	100	58,8%	70	41,2%	0,497	0,77	0,37-1,62
ÚLCERAS ORAIS/NASAIS – ACR	SIM	24	57,1%	18	42,9%	0,683	0,87	0,44-1,72
FAN – ACR	SIM	124	60,2%	82	39,8%	0,401	NA	NA
ALTERAÇÃO IMUNOLÓGICA - ACR	SIM	74	54,4%	62	45,6%	0,026	0,51	0,27-0,92
PSICOSE CONVULSÕES – ACR	SIM	16	64,0%	9	36,0%	0,656	1,22	0,51-2,90

Tabela 3 - Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene TNFA (-308 G/A) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) conforme características clínicas relacionadas com o critério ACR Serosites.

Características clínicas	TFNA -308 G/A							
		GG		GA/AA		P	OR	IC
		N	%	N	%			
PLEURISIA	SIM	15	40,5%	22	59,5%	0,008	0,38	0,18-0,79
PERICARDITE	SIM	2	7,1%	26	92,9%	<0,001	0,04	0,01-0,16
FEBRE	SIM	73	55,3%	59	44,7%	0,073	0,58	0,32-1,05
DERRAME PLEURAL	SIM	21	44,7%	26	55,3%	0,015	0,45	0,23-0,86
HIPERTENSÃO PULMONAR	SIM	0	0,0%	3	100,0%	0,063	NA	NA
PNEUMONIA	SIIM	16	64,0%	9	36,0%	0,656	1,22	0,51-2,90
EMBOLIA PULMONAR	SIM	5	71,4%	2	28,6%	0,704	NA	NA
PNEUMONITE	SIM	5	50,0%	5	50,0%	0,526	NA	NA
MIOCARDITE	SIM	1	100,0%	0	0,0%	1,000	NA	NA
HIPERTENSÃO ARTERIAL	SIM	55	77,5%	16	22,5%	<0,001	3,34	1,74-6,40
DISLIPIDEMIA	SIM	9	75,0%	3	25,0%	0,369	NA	NA
RAYNAUD	SIM	43	61,4%	27	38,6%	0,749	1,10	0,61-1,99
TROMBOSE VENOSA	SIM	10	76,9%	3	23,1%	0,196	2,34	0,62-8,77
TROMBOSE ARTERIAL	SIM	5	71,4%	2	28,6%	0,704	NA	NA
IAM	SIM	0	0,0%	1	100,0%	0,401	NA	NA
VASCULITE	SIM	0	0,0%	17	100,0%	<0,001	2,88	2,37-3,50

Tabela 4 - Distribuição genotípica do polimorfismo da região promotora do gene TNFA (-308 G/A) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) conforme o resultado dos Exames imunológicos.

Exames laboratoriais	TFNA -308 G/A							
	GG		GA/AA		P	OR	IC	
	N	%	N	%				
FAN – ALTERADO	SIM	122	59,5%	83	40,5%	1,000	NA	NA
Sm – ALTERADO	SIM	41	64,1%	23	35,9%	0,413	1,32	0,68-2,56
RNP – ALTERADO	SIM	32	58,2%	23	41,8%	0,571	0,82	0,41-1,63
Ssa/Ro – ALTERADO	SIM	36	59,0%	25	41,0%	0,792	0,91	0,47-1,79
Ssb/La – ALTERADO	SIM	12	50,0%	12	50,0%	0,274	0,61	0,25-1,48
ANTI Ds DNA – ALTERADO	SIM	54	52,4%	49	47,6%	0,039	0,55	0,31-0,97
COMPLEMENTO – ALTERADO	SIM	90	58,1%	65	41,9%	0,276	0,69	0,36-1,34
ANTICARDIOLIPINA - ALTERADO	SIM	9	52,9%	8	47,1%	0,889	1,08	0,36-3,25
INIBIDOR LÚPICO – ALTERADO	SIM	2	66,7%	1	33,3%	1,000	NA	NA

6 DISCUSSÃO

O LES é uma doença auto-imune complexa desenvolvida por indivíduos geneticamente propensos e sob influência de fatores ambientais. A doença é caracterizada pela perda da tolerância imunológica, produção de auto-anticorpos contra antígenos nucleares, e também pela heterogeneidade de suas manifestações clínicas que variam desde *rash* cutâneo e úlceras orais até alterações do SNC, como convulsões e psicoses (JUSTIZ-VAILLANT; E. AKPAKA; POONKING, 2015).

A maioria dos estudos epidemiológicos que estimam a incidência e prevalência de Lúpus foi conduzida em países da Europa e Estados Unidos. No Brasil esses dados são escassos, e os raros estudos exibem taxas de incidência que variam acentuadamente. Nakashima e colaboradores (2011) estimaram incidência de 4,8 casos a cada 100.000 habitantes/ano em município localizado na região Sul do país, Cascavel – PR e em estudo semelhante realizado na cidade de Natal – RN, a taxa de incidência foi de 8,7 casos a cada 100.000 habitantes/ano (VILAR; RODRIGUES; SATO, 2003).

Especula-se que as diferenças observadas possam ser atribuídas aos fatores ambientais, variação na incidência de raios ultravioleta nas diferentes regiões do país, fatores econômicos, tais como, a variação do IDH e também composição étnica do local estudado (NAKASHIMA et al., 2011). Isso porque o LES é uma doença que afeta todas as etnias e é cerca de nove a 10 vezes mais frequente em mulheres durante a idade fértil, quando comparado a homens (MANSON; RAHMAN, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Dentre os fatores fisiológicos associados ao desenvolvimento de Lúpus, as citocinas desempenham papel essencial na etiopatogenia do LES, dado que a produção destas moléculas é controlada a nível genético e os polimorfismos funcionais nos seus promotores podem influenciar o desenvolvimento e gravidade da doença (SUÁREZ; LÓPEZ; GUTIÉRREZ, 2010).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida em vários processos biológicos que são atribuídos a muitas doenças, assim como o LES, tais como o aumento da permeabilidade da barreira epitelial, ativação de macrófagos,

recrutamento de infiltrados inflamatórios, efetividade de respostas inflamatórias e amplificação do efeito de outras citocinas inflamatórias (JIMMÉNEZ-MORALES et al., 2009).

A citocina TNF- α desempenha funções celulares imunomoduladora e pró-inflamatória no sistema imune inato e adaptativo. Está diretamente envolvida com sinalização apoptótica e anti-apoptótica, ativação da transcrição de NF- κ B, além da estimulação de linfócitos B e T na produção de citocinas. Resultados obtidos a partir de estudos que investigaram o papel do polimorfismo no gene TNFA, expressão do gene e aumento dos níveis de TNF- α no soro de pacientes, demonstram que a citocina TNF- α atua como efector pró-inflamatório em pacientes com LES (POSTAL; APPENZELLER, 2011).

Neste contexto, alguns estudos têm encontrado associação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) da região promotora do gene TNFA -308 G/A (rs1800629) como fator de risco para LES e para desenvolvimento de manifestações clínicas em diferentes grupos étnicos (AHMED et al., 2014; ANGELO et al., 2012; LIN et al., 2009; P. et al., 2015; SANTOS et al., 2012).

Também é digno de nota as semelhanças e diferenças da distribuição genotípica na região gênica estudada em diferentes países (tabela 5). No presente estudo por exemplo, percebe-se que 59,90% dos pacientes são portadores do genótipo GG na região estudada; resultado semelhante ao outro grupo brasileiro já descrito (com 59,18% dos pacientes).

Tabela 5 - Distribuição do genótipo GG da região promotora do gene TNFA (-308) em pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico (LES) conforme o grupo étnico/país citado na literatura.

Autor	Ano	Grupo étnico/país	Frequência do genótipo GG (rs1800629)
Angelo et al	2012	Brasil (Pernambuco)	59,18% (n= 58)
Ahmed et al	2014	Egito	42,00% (n= 42)
Santos et al	2012	Portugal	68,70% (n= 79)
Piotrowski et al	2015	Polônia	61,83% (n=162)
Lin et al	2009	Tailândia	82,00% (n=132)
Presente estudo	2016	Brasil (Distrito Federal)	59,90% (n=124)

Lin e colaboradores (2009) demonstraram correlação significativa da presença do alelo A do polimorfismo do gene TNFA (-308 G/A) com *rash* malar, úlceras orais, serosites, e manifestações hematológicas em população Tailandesa com LES. Também Ahmed e colaboradores (2014) apresentaram associação significativa entre o genótipo AA+GA do SNP do gene TNFA (-308 G/A) com *rash* malar, úlceras orais e serosites em pacientes egípcios com Lúpus. Do mesmo modo, Angelo e colaboradores (2012) também encontraram associação significativa do genótipo GG como fator protetor para Serosites em pacientes brasileiros com LES. Os resultados aqui apresentados mostram que o genótipo GG para o SNP da região promotora do gene TNFA (-308 G/A) contribui significativamente como fator protetor para Serosites – ACR, corroborando com outros achados da literatura descritos acima. Por outro lado, a presente pesquisa identificou também associação do genótipo GG com Alterações Imunológicas – ACR e com as características clínicas em pacientes com LES: Pleurisia, Pericardite, Derrame pleural e Anti-dsDNA – Alterado.

O critério presença de Serosites (ACR) para classificação do LES corresponde à inflamação de membranas serosas que incluem o pericárdio, pleura e peritônio. Esta alteração pode levar à dor, acúmulo de fluidos, adesão e por vezes fibrose dessas estruturas (MAN; MOK, 2005). Já o derrame pleural também pode ocorrer em pacientes com comprometimento pulmonar, mais especificamente na pneumonite aguda lúpica, com quadro de febre, dispneia e tosse, com ou sem cianose ou escarro hemoptoico (INOUE, 2008).

Por outro lado, as alterações imunológicas estão intimamente associadas à presença de anticorpos anti-DNA nativo (anti-dsDNA). Para a determinação destes anticorpos deve-se levar em consideração as limitações das duas principais técnicas empregadas: por Imunofluorescência Indireta (IFI), tendo como substrato a *Chritidia luciliae*, é observado baixa sensibilidade (50% a 60% na doença ativa), enquanto que pela técnica de ELISA, apesar de haver aumento da sensibilidade, ocorre redução da especificidade, podendo ocorrer positividade para outras doenças (INOUE, 2008).

Embora exista uma forte agregação familiar, o LES é uma doença relativamente incomum e a maioria dos casos são esporádicos. A doença pode se

manifestar associado à outra condição auto-imune, tais como, tireoidites, anemia hemolítica e púrpura trombocitopênica idiopática (JUSTIZ-VAILLANT; E. AKPAKA; POONKING, 2015).

Desta forma, os achados aqui descritos sugerem que o polimorfismo da região promotora do gene TNFA -308 G/A pode desempenhar um importante papel na susceptibilidade e patogênese para LES na população brasileira.

7 CONCLUSÃO

Este estudo contribui para a verificação da associação do gene TNFA na patogênese do LES em diferentes populações. Ressalta-se que a população brasileira é altamente miscigenada, de grande variabilidade genética e possui distribuição alélica e genotípica muito parecida com a população mundial, segundo dados do NCBI.

Os resultados também foram capazes de encontrar associação estatística entre o genótipo homozigoto dominante (GG) na região -308 do gene TNFA e diversas manifestações clínicas. Observa-se que a ocorrência de Serosites segue disposto na literatura e demonstra associação do gene TNFA para diferentes etnias. Entretanto, nossos resultados divergem da literatura ao considerar a associação de genótipo GG e Alterações Imunológicas.

Contudo, destaca-se que sendo o LES uma doença complexa e multifatorial que pode apresentar variações em sua frequência, manifestação clínica e gravidade nas diferentes etnias e raças (GONZÁLEZ; TOLOZA; ALARCÓN, 2014) e que pode ter, atrelados à sua patogênese e desenvolvimento, fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, é importante e necessário que haja maior investigação em diferentes populações para que se tenha um resultado mais sólido acerca da influência do polimorfismo da região promotora do gene TNFA (rs1800629) e a ocorrência, manifestação clínica e gravidade de Lúpus Eritematoso Sistêmico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, L. J.; KROEGER, K. M. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. **Journal of leukocyte biology**, v. 66, n. 4, p. 562–566, 1999.
- AHMED, H. H. et al. Association between TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms and systemic lupus erythematosus. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 4, p. 2029–2036, 2014.
- ANGELO, H. D. et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism -308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Human Immunology**, v. 73, n. 11, p. 1166–1170, 2012.
- CRISPÍN, J. C. et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. **Trends in molecular medicine**, v. 16, n. 2, p. 47–57, 2010.
- GHEITA, T. A. et al. Clinical significance of serum TNF α and -308 G/A promoter polymorphism in rheumatoid arthritis. **Egyptian Rheumatologist**, v. 37, n. 2, p. 49–54, 2015.
- GHODKE-PURANIK, Y.; NIEWOLD, T. B. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v. 64, p. 125–136, 2015.
- GLESSE, N. et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases and cytochrome P450 enzymes as susceptibility factors to systemic lupus erythematosus in southern Brazilian patients. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 9, p. 6167–6179, 2014.
- GOLSHANI, H. et al. Association of TNF- α 308G/A polymorphism with type 2 diabetes: A case-control study in the Iranian Kurdish ethnic group. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 6, n. 2, p. 94–99, 2015.
- GONZÁLEZ, L. A.; TOLOZA, S. M. A.; ALARCÓN, G. S. Impact of race and ethnicity in the course and outcome of systemic lupus erythematosus. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 433–454, 2014.
- HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology Revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1997, 1997.
- INOUE, S. E. Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Voltarelli29**. indd 66p 651 - 662 - 2008 Capítulo 29.
- JIMMÉNEZ-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**, v. 70, n. 4, p. 251–256, 2009.
- JUSTIZ-VAILLANT, A.; E. AKPAKA, P.; POONKING, P. Systemic Lupus Erythematosus: some Epidemiological and Clinical Aspects. **American Journal of Public Health Research**, v. 3, n. 2, p. 46–50, 2015.
- LIN, Y. J. et al. IL-10 and TNF- α promoter polymorphisms in susceptibility to systemic lupus erythematosus in Taiwan. **Clin Exp Rheumatol**, v. 28, n. 3, p. 318–324, 2010.
- LIN, Y.-J. et al. Association of TNF- α gene polymorphisms with systemic lupus

- erythematosus in Taiwanese patients. **Lupus**, v. 18, n. 11, p. 974–979, 2009.
- MAN, B. L.; MOK, C. C. Serositis related to systemic lupus erythematosus: prevalence and outcome. **Lupus**, v. 14, n. 10, p. 822–6, 2005.
- MANSON, J. J.; RAHMAN, A. Systemic lupus erythematosus. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 1, p. 6, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**, p. 353–382, 2013.
- NAKASHIMA, C. A. K. et al. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do Lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 235–239, 2011.
- P., P. et al. TNF-308 G/A polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus in the Polish population. **Modern Rheumatology**, v. 25, n. 5, p. 719–723, 2015.
- POSTAL, M.; APPENZELLER, S. The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-a) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 56, n. 3, p. 537–543, 2011.
- SANTOS, M. J. et al. TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology International**, v. 32, n. 8, p. 2239–2244, 2012.
- SUÁREZ, A et al. Differential effect of IL10 and TNF α genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 64, n. 11, p. 1605–10, 2005.
- SUÁREZ, A.; LÓPEZ, P.; GUTIÉRREZ, C. IL-10 and TNF α genotypes in SLE. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.
- TAHGHIGHI, F. et al. Tumor necrosis factor-alpha single nucleotide polymorphisms in juvenile systemic lupus erythematosus. **Human Immunology**, v. 76, n. 8, p. 533–536, 2015.
- TAN, E. M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 25, n. 11, p. 1271–1277, 1982.
- VILAR, M. J. P.; RODRIGUES, J. M.; SATO, E. I. Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN - Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 6, p. 347–351, 2003.

ANEXO

Aprovação do projeto pelo comitê de ética



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 309/2009

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 353/09 – POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 03/11/2011

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 03 de novembro de 2009.

Atenciosamente,

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP: 70.710-904

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE