

PAOLA ROSA LUZ

**ANÁLISE DA RELEVÂNCIA CLÍNICA DOS GENES *TNF* (-308),  
*LTA* (+252) E *LTA* (+368) NO PROGNÓSTICO DO  
ALOENXERTO RENAL**

Monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas, apresentado à disciplina de Estágio II referente ao trabalho que foi realizado no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade federal do Paraná, no período de abril de 2003 a janeiro de 2004.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria da Graça Bicalho.

CURITIBA  
2004

*A todos os pacientes transplantados,  
que este trabalho possa contribuir de  
alguma forma na melhoria da qualidade  
de vida destas pessoas.*

## AGRADECIMENTOS

À meus pais pelo apoio e pelo carinho constantes.

Aos meus queridos sobrinhos (Gegê e Rick) pela alegria que trazem a minha vida e pelo amor incondicional.

Àos meus irmãos: Evelyn, pelo carinho, e Sandro, pela paciência e, principalmente, por ter me cedido seu computador.

Aos meus queridos amigos da graduação (André, Cynthia, Fernanda, Gilson, Gustavo, Kleiton, Heloísa, Luciana, Rafael Noletto, Rafael Mazer, Silvana, e Thaís) pela amizade e pelos momentos de descontração.

À Profa. Maria da Graça Bicalho pela dedicação durante a orientação neste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, especialmente a Fernanda, Savana e Sônia pelos ensinamentos, amizade e pelo bom convívio.

Ao Dr. Ricardo Benvenuto e Eliandra Aparecida Silva Olszewski, pela ajuda na consulta dos prontuários médicos dos pacientes transplantados.

Ao Prof. Juarez Gabardo, pela ajuda na análise estatística deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>SUMÁRIO</b> .....	iv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	02
2.1 CITOCINAS.....	02
2.1.1 Características.....	02
2.1.2 Histórico.....	02
2.1.3 Nomenclatura.....	03
2.1.4 Propriedades.....	04
2.1.5 Classificação.....	05
2.1.6 A descoberta do Fator de Necrose Tumoral.....	05
2.1.7 Papéis das citocinas TNF- $\alpha$ e LT- $\alpha$ na imunidade.....	07
2.2 REJEIÇÃO.....	12
2.2.1 Definição.....	12
2.2.2 Tipos.....	12
2.2.2.1 A rejeição hiperaguda.....	12
2.2.2.2 A rejeição aguda.....	13
2.2.2.3 Nefropatia crônica do enxerto.....	13
2.2.3 Citocinas e a fisiologia da rejeição/ aceitação do aloenxerto.....	14
2.2.4 Vias do aloreconhecimento.....	16
2.3 OS GENES <i>TNF</i> E <i>LTA</i> .....	18
2.3.1 Estrutura gênica.....	18
2.3.2 Variantes polimórficas e sua influência na transcrição.....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	24

<b>4 JUSTIFICATIVA</b> .....	25
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	27
5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
6.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS.....	29
6.2 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS <i>TNF</i> E <i>LTA</i> E DOENÇAS RENAIS.....	31
6.3 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS <i>TNF</i> E <i>LTA</i> E EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO AGUDA.....	32
6.4 DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS <i>TNF</i> E <i>LTA</i> E INFECÇÕES PÓS-TRANSPLANTE RENAL.....	34
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS GENES *TNF* -308, *LTA*+252 E *LTA*+368 DAS AMOSTRAS PACIENTE E CONTROLE.....PAG 29

TABELA 2 FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS REFERENTES AO GENE *TNF* NA POSIÇÃO -308..... PAG 30

TABELA 3 FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS REFERENTES AO GENE *LTA* NA POSIÇÃO +252.....PAG 30

TABELA 4 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *TNF* NA POSIÇÃO -308 E EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO AGUDA.....PAG 32

TABELA 5 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *LTA* NA POSIÇÃO +252 E EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO AGUDA.....PAG 32

TABELA 6 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *TNF* NA POSIÇÃO -308 E OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO PÓS-TRANSPLANTE.....PAG 34

TABELA 7 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *LTA* NA POSIÇÃO +252 E OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO PÓS-TRANSPLANTE.....PAG 34

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 POSSÍVEIS FENÓTIPOS E RESPECTIVOS GENÓTIPOS DE <i>TNF</i> E <i>LTA</i> .....	PAG 28
---	--------

## 1 INTRODUÇÃO

Citocinas são proteínas mediadoras da fase efetora da imunidade inata e específica. São pequenos polipeptídeos endógenos solúveis, fundamentais para a comunicação celular, que regulam as respostas inflamatória e imune. Diferentes indivíduos têm sido classificados como "altos" e "baixos" produtores, de acordo com o nível de citocinas quantificado no soro ou plasma. Esta variação nos níveis de expressão deve-se a presença de nucleotídeos polimórficos em regiões reguladoras dos genes que codificam as citocinas. Tem-se sugerido que o polimorfismo dos genes *TNF* e *LTA* que codificam as citocinas  $TNF-\alpha$  e  $LT-\alpha$ , respectivamente, afeta a expressão destes genes, os quais têm sido relacionados com a aceitação/rejeição de aloenxertos e com a susceptibilidade às infecções. Um indivíduo geneticamente programado para produzir níveis elevados de uma citocina inflamatória, e reduzidos de uma citocina antiinflamatória, torna-se mais suscetível a condições inflamatórias, tais como episódios de rejeição e infecções. Estudos recentes apontam a relevância clínica do monitoramento contínuo das citocinas produzidas pelo receptor, após o transplante renal. Com base nestas evidências, o conhecimento prévio do genótipo *TNF* e *LTA* dos receptores, pode contribuir de maneira importante no prognóstico e monitoramento de prováveis episódios de rejeição aguda e infecções pós-transplante renal. Este trabalho tem como objetivo principal comparar as distribuições alélicas, genotípicas e fenotípicas dos genes *TNF* (na posição -308) e *LTA* (nas posições 252 e 368) entre uma amostra composta por indivíduos transplantados renais (n=49) e controles (n=42) - pertencentes ao banco de dados do LIGH - investigando sua possível relação com a etiologia de doenças renais, episódios de rejeição aguda e infecções pós-transplante.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CITOCINAS

#### 2.1.1 Características

As citocinas são um grupo diverso de proteínas de sinalização intercelular que regulam não somente as respostas imunes locais e sistêmicas, mas também outros processos biológicos, tais como a hematopoese (STITES *et al.*, 2000). Incluem as interleucinas, interferons e os produtos dos genes da família do fator de necrose tumoral (KEEN, 2002).

Muitas são glicoproteínas com peso molecular entre 6.000 e 60.000 kDa. São compostos extremamente potentes que atuam em concentrações muito baixas ( $10^{-9}$  a  $10^{-15}$  M), através da interação específica com receptores de superfície de células-alvo (STITES *et al.*, 2000).

Poucas citocinas estão presentes normalmente em quantidades detectáveis no sangue e são capazes de influenciar células-alvo distantes. Quando secretadas, individualmente ou como parte de uma resposta coordenada, têm efeitos sobre o crescimento, a motilidade, a diferenciação ou a função de suas células-alvo, como células T por exemplo (OPPENHEIM & RUSCETTI, 2000).

São rapidamente sintetizadas e liberadas em grandes quantidades por certas células após determinados estímulos, interagindo entre si de uma forma complexa e apresentando efeitos sinérgicos e redundantes (NORONHA & SAMPAIO, 1997).

#### 2.1.2 Histórico

A atividade das citocinas foi primeiramente reconhecida em meados dos anos 60, quando se observou que sobrenadantes derivados de cultura de linfócitos

continham fatores que poderiam regular a proliferação, a diferenciação e maturação de células do sistema imune (KUBY, 1995).

Na década de 70, conseguiu-se a purificação parcial e a caracterização de muitas citocinas individuais, bem como a produção de anti-soros neutralizantes específicos. Neste período, apreciou-se pela primeira vez que diversos efeitos atribuídos à citocinas estudadas por diferentes investigadores muitas vezes eram mediados pelas mesmas moléculas. Por exemplo, o IFN- $\gamma$  foi descoberto por virologistas como proteína antiviral derivada dos linfócitos T e independentemente descoberto por imunologistas como ativador das funções dos macrófagos (ABBAS *et al.*, 2000).

### 2.1.3 Nomenclatura

As citocinas foram inicialmente denominadas linfocinas pois, à época, acreditava-se que estas seriam produzidas somente por linfócitos. Mais tarde foi demonstrado que monócitos-macrófagos também as sintetizavam e introduziu-se o termo monocina. Quando verificou-se que além de linfócitos e monócitos-macrófagos outros tipos celulares apresentavam esta capacidade, o termo genérico citocina foi adotado (NORONHA & SAMPAIO, 1997).

Pelo fato de muitas citocinas serem produzidas por certas populações de leucócitos do sangue (como células T ou monócitos) e interagirem com outras (como monócitos, neutrófilos ou eosinófilos), estas moléculas são algumas vezes chamadas de interleucinas (ABBAS *et al.*, 2000).

O termo interleucina foi introduzido para descrever citocinas capazes de atuar em leucócitos de maneira específica e tem sido útil à medida que novas citocinas vêm sendo caracterizadas, sendo então denominadas por um número de interleucina (por exemplo, IL-1), assegurando que não haverá ambigüidade de nomenclatura entre os investigadores (ABBAS *et al.*, 2000; THOMSOM & LOTZE, 2003).

Recentemente um grande número de novas citocinas tem sido identificado (KEEN, 2002). A descoberta de um grande número de citocinas está associada à pesquisa em doenças infecciosas ou à pesquisa relacionada à resposta imune induzida por antígenos (ABBAS *et al.*, 2000).

#### 2.1.4 Propriedades

Embora as citocinas sejam um grupo diverso de proteínas, há numerosas propriedades compartilhadas por estas moléculas:

- Atuam sobre muitos tipos celulares diferentes e costumam ter múltiplos efeitos diferentes sobre a mesma célula-alvo (efeito pleiotrópico),
- As ações das citocinas costumam ser redundantes, ou seja, diferentes citocinas podem ter ações similares,
- A exposição de células à duas ou mais citocinas ao mesmo tempo pode conduzir à respostas qualitativamente diferentes (sinergismo/ antagonismo)
- Influenciam a ação (inibindo ou estimulando a ação ou função de outras citocinas) e a síntese de outras citocinas (aumentando ou diminuindo sua produção),
- Como outros hormônios polipeptídicos, as citocinas iniciam sua ação por ligação a receptores específicos na superfície da célula-alvo. A célula-alvo relevante pode ser a mesma célula que secreta a citocina (ação autócrina), uma célula vizinha (ação parácrina) ou, como os hormônios, uma célula distante estimulada por meio de citocinas secretadas na circulação (ação endócrina),

As ações de citocinas individuais na imunidade são complexas, uma vez que elas agem em um micro-ambiente repleto de uma população heterogênea de células em diferentes estágios de ativação (HAUSER *et al.*, 1995).

### 2.1.5 Classificação

A classificação das citocinas pode ser baseada em uma série de critérios. Alguns às classificam com base no tipo de célula que às produz, entretanto, a classificação mais comum é entre os grupos Th1 e Th2 (KEEN, 2002).

As citocinas do tipo Th1 incluem interleucina-2 (IL-2), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e interferon-gama (INF- $\gamma$ ), mediam a resposta imune celular e são pró-inflamatórias. As citocinas do tipo Th2 incluem IL-4, IL-5 e IL-10, têm sido mostradas por inibir o desenvolvimento e função das células Th1, suprimir a resposta inflamatória e implementar as vias humorais da resposta imune (SANKARAN *et al.*, 1999).

Esta classificação é somente uma generalização, pois citocinas tais como a IL-6 podem exercer ambas atividades, pró e anti-inflamatória, de acordo com o sistema de células envolvido (KEEN, 2002).

Dentro do sistema imune, respostas diferenciais à estimulação por citocinas podem exercer controle no balanço Th1/ Th2. A perturbação desse balanço em cada direção poderia ter implicações fundamentais para o curso clínico de muitas infecções e doenças imunes. Muito interesse científico está sendo aplicado nesse momento para examinar o papel do polimorfismo dos genes das citocinas e de seus receptores e como eles podem afetar esse balanço (KEEN, 2002).

Em níveis baixos, citocinas inflamatórias são essenciais para o funcionamento ótimo da nossa defesa e sistemas de reparo. As mesmas citocinas em altos níveis, entretanto, são mediadores potencialmente perigosos de infecções e reações imunoinflamatórias (BENDTZEN, 1994).

### 2.1.6 A descoberta do Fator de Necrose Tumoral

No final do século XIX, alguns médicos americanos, observaram que o desaparecimento de tumores malignos em pacientes, algumas vezes coincidia com o desenvolvimento de uma infecção bacteriana. A partir desta constatação, postulou-se

que agentes infecciosos ou seus produtos poderiam, em alguns casos, combater o câncer. Algumas evidências sugeriram que a bactéria não eliminaria o tumor diretamente, mas contribuiria indiretamente, estimulando outros mecanismos fisiológicos capazes de provocar a regressão de um tumor cancerígeno (OLD, 1988).

A história da descoberta do fator de necrose tumoral começa com William B. Coley (citado por OLD, 1988), um cirurgião do Hospital Memorial de Nova Iorque, que por volta de 1890, baseando-se em evidências anteriores (regressão de tumores malignos) teve algum sucesso no tratamento de pacientes com câncer, infectando-os com concentrados bacterianos.

Entretanto, somente em 1975 a proteína responsável pela necrose de tumores foi identificada e subsequentemente foi denominada "fator de necrose tumoral" (TNF), por Elizabeth Carswell *et al.* (citado por PENNICA *et al.*, 1984).

Duas isoformas do gene *TNF* foram descritas:  $TNF-\alpha$  e  $LT-\alpha$  (antigamente denominado  $TNF-\beta$ ). Células mononucleares do sangue periférico produzem ambas isoformas de TNF.  $TNF-\alpha$  é produzido durante a ativação imune em grande quantidade e tem sido mais extensivamente estudado (FREEMAN *et al.*, 1999).

Enquanto  $LT-\alpha$  é produzido principalmente por células T estimuladas,  $TNF-\alpha$  é o produto de macrófagos ativados, bem como de células "natural Killer" (NK), sendo também expresso em células endoteliais (GRELL *et al.*, 1995).

A proteína  $TNF-\alpha$  também é secretada por células hematopoéticas, tais como células T e B, granulócitos e células de outras linhagens tais como células epidérmicas, hepatócitos, fibroblastos e células ovarianas. Entretanto, monócitos e macrófagos são as principais fontes de  $TNF-\alpha$  (MAK & SIMARD, 1998).

Do ponto de vista estrutural, o  $TNF-\alpha$  apresenta-se sob duas formas distintas: a forma expressa na membrana ( $TNF_m$ ) de aproximadamente 26 kDa, e a forma solúvel ou secretada (TNFs) (GRELL *et al.*, 1995). Apesar da relação entre as duas formas de  $TNF-\alpha$ , foi demonstrado que a forma transmembrânica, a princípio, é bioativa e confere em situações de sinalização intercelular, uma resposta de citotoxicidade (GRELL *et al.*, 1995). TNFs exerce uma série de atividades inflamatórias e imunomodulatórias que são importantes na defesa do hospedeiro. (HAJEER & HUTCHINSON, 2001).

Embora o TNF- $\alpha$  tenha sido inicialmente descoberto pela sua atividade anti-cancerígena, esforços para elucidar suas funções revelaram que trata-se de uma citocina que possui um papel central na regulação da inflamação e da imunidade; processos interligados que limitam e reparam danos na infecção, orquestrando as reações de defesa do organismo (OLD, 1988).

O TNF- $\alpha$  também foi conhecido como caquexina, baseado em experimentos realizados em coelhos infectados por parasitas. Os resultados mostraram que esses animais desenvolviam uma grave perda de peso associada com hipertrigliceridemia e deficiência de lipoproteína-lipase (LPL), uma enzima envolvida na hidrólise de triglicerídeos. Esse quadro clínico é conhecido como caquexia (OLIFF, 1988). Atualmente sabe-se que o TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica. Após ligação com os receptores de membrana, TNF- $\alpha$  desencadeia efeitos diversos em diferentes órgãos e tecidos (EIGLER *et al.*, 1997).

### 2.1.7 Papéis das citocinas TNF- $\alpha$ e LT- $\alpha$ na imunidade

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a linfotóxina alfa (LT- $\alpha$ ), originalmente caracterizados por suas habilidades em induzir a apoptose em células de tumor e a caquexia, são agora considerados como mediadores centrais de uma ampla cadeia de atividades biológicas. Estas atividades englobam efeitos benéficos para o hospedeiro, em processos inflamatórios e em respostas imunes protetoras contra uma variedade de patógenos infecciosos (PFEFFER, 2003). Há evidências de que certos vírus e células cancerosas têm adotado estratégias de interferir com a rede de citocinas a fim de evitar a resistência natural do hospedeiro (BENDTZEN, 1994).

Trabalhos recentes têm demonstrado grande variabilidade interindividual na produção de TNF- $\alpha$ , em pacientes saudáveis, em resposta a estímulos similares (SAHOO *et al.*, 2000). Uma pessoa geneticamente programada para produzir níveis elevados de TNF- $\alpha$  (uma citocina pró-inflamatória) e reduzidos de IL-10 (uma citocina anti-inflamatória) é mais suscetível a condições inflamatórias. Dessa forma, essas

diferenças hereditárias podem contribuir para a susceptibilidade às infecções, alergias e a auto-imunidade (ROITT *et al.*, 2003).

Existe um número crescente de estudos que procuram associar o polimorfismo dos genes das citocinas com a susceptibilidade, severidade e prognóstico de doenças imunes (KEEN, 2002). Em doenças autoimunes *TNF* é um dos genes mais estudados (HAJEER & HUTCHINSON, 2001). O papel do  $TNF-\alpha$  na patogênese de distúrbios autoimunes é pouco compreendido. Muitos dos dados que relacionam  $TNF-\alpha$  ao desenvolvimento da autoimunidade têm sugerido um papel deletério, mas a vasta maioria desses estudos foi realizada *in vitro*, então sua relevância biológica não é evidente. Evidências a favor de um papel patogênico têm sido originadas principalmente de experimentos *in vitro*, enquanto que estudos *in vivo*, em modelos animais, têm sugerido um papel protetor (JACOB, 1992).

$TNF-\alpha$  (junto com muitas outras citocinas) é freqüentemente encontrado no local das reações inflamatórias (JACOB, 1992).  $TNF-\alpha$  pode ser detectado no plasma ou no líquido sinovial obtido de pacientes com artrite reumatóide, enquanto que está ausente em indivíduos saudáveis (BEUTLER & BAZZONI, 1998).  $TNF-\alpha$  também está envolvido no choque séptico, principalmente em pacientes com septicemia meningocócica, podendo levar à morte pacientes com altos níveis de  $TNF-\alpha$  circulante (OLD, 1987). Segundo Jacob (1992), a presença de uma dada citocina durante o processo da doença não necessariamente implica em um papel patológico. A evidência que o  $TNF-\alpha$  exacerba a patologia autoimune é contrabalanceada pelo mérito de um papel benéfico em doenças. Dependendo do tempo, células alvo e magnitude da reação inflamatória,  $TNF-\alpha$  pode mostrar propriedades benéficas para o hospedeiro (JACOB, 1992).

O papel do  $TNF-\alpha$  na inflamação, similarmente ao seu papel em doenças autoimunes, talvez seja tanto benéfico (protetor) quanto deletério (patológico). Enquanto estudos fisiológicos têm geralmente focado o papel do  $TNF-\alpha$  como um potente mediador no desenvolvimento progressivo da inflamação, os estudos descritos em Jacob (1992), talvez forneçam um novo entendimento deste papel fisiológico.

Nos estudos em que se procura associar TNF com infecção, dois sítios polimórficos bialélicos Nco I têm sido estudados extensivamente: um na região promotora do gene *TNF* e o outro no primeiro íntron do gene *LTA* (SAHOO *et al.*, 2000).

Em Sahoo *et al.* (2000) pacientes com choque séptico que possuíam o sítio Nco I tiveram redução significativa de TNF- $\alpha$  em seu plasma e conhecida diminuição da mortalidade.

Em um estudo com transplantados de fígado, Freeman *et al.* (1999) encontraram nos pacientes com o sítio NcoI, um claro aumento nas taxas de infecção e no número de infecções por paciente. Isto sugere estes indivíduos, sob imunossupressão, são mais susceptíveis à infecções pós-transplante. Uma explanação para esses achados é que a resposta imune a estímulos infecciosos é mais dependente de TNF. Em resposta a estímulos infecciosos, diferenças na transcrição de *TNF* devido a polimorfismos genéticos podem se manifestar. Desse modo, indivíduos com o sítio NcoI são menos capazes de produzir TNF apropriado para montar uma resposta efetiva.

A incidência de infecções do trato urinário (UTI) durante os três primeiros meses após o transplante renal excede 30%. A consequência clínica de UTI pós transplante pode incluir manifestações tais como bacteremia ou ativação de CMV (citomegalovírus) que podem causar dano ao enxerto (KIMBALL & REID, 2002).

Kimball & Reid (2002) mostraram que o alelo baixo produtor do gene *LTA* (\*252G) estava associado com uma alta frequência de UTI enquanto que o alelo alto produtor (\*252A) associava-se com uma relativa liberdade de UTI precoce. Tais descobertas são similares aos relatórios ligando a variação em alelos *TNF* com a propensão em desenvolver infecções bacteriana e viral durante o primeiro ano após o transplante. Embora UTI's tenham sido mais comuns entre afro-americanos que em caucasóides, no referido trabalho, isto parece estar associado com a maior expressão do alelo baixo produtor naquela população. Os resultados deste estudo não sustentam uma correlação entre o genótipo *LTA* e função tardia do enxerto (DGF), rejeição precoce ou sobrevivência do enxerto no primeiro ano pós-transplante.

Indivíduos não imunossuprimidos que possuem um sítio de restrição para a enzima Nco I, no locus do gene *TNF*, produzem menos TNF- $\alpha$  in vitro e in vivo do que



os indivíduos com ausência deste sítio. Tem sido demonstrada uma clara associação entre a presença do genótipo NcoI+/baixo produtor de TNF- $\alpha$  e as taxas e números de infecções em pacientes submetidos ao transplante renal. Esta associação entre infecções pós-transplante renal e o genótipo *TNF* é também corroborada pelo fato de que os estudos com transplante renal são quase idênticos a aqueles já relatados em estudos com receptores transplantados de fígado. Estes dados juntos fortalecem as conclusões de que os receptores transplantados sob imunossupressão, que possuem o sítio Nco I, são mais propensos à infecções. Dessa forma, indivíduos que possuem o sítio Nco I sob imunossupressão, a qual inibe a produção de TNF- $\alpha$ , são incapazes de produzir quantidade apropriada de TNF- $\alpha$  para uma resposta efetiva contra infecções (SAHOO *et al.*, 2000).

Sahoo *et al.* (2000) demonstraram que o alelo baixo produtor de TNF- $\alpha$  (\*-308G) estava associado com uma propensão à infecções durante o primeiro ano após o transplante. Entretanto, segundo ABRAHAM & KROEGER (1999) indivíduos altos produtores desta citocina têm um pior prognóstico no que se refere à certas doenças infecciosas.

Embora TNF- $\alpha$  e LT- $\alpha$  estejam teoricamente envolvidos na preservação da homeostase celular e bioquímica por participar na remodelagem dos tecidos e nas respostas de defesa do hospedeiro, uma produção insuficiente ou excessiva dessas citocinas resultará em condições anormais, como injúria do tecido, choque e morte (SAHOO *et al.*, 2000).

A aplicação terapêutica de TNF- $\alpha$  tem sido investigada em muitas doenças graves, embora muitos estudos estejam sendo limitados pela alta taxa de efeitos colaterais provocados pelo próprio TNF- $\alpha$  (EIGLER *et al.*, 1997).

Existe um grande interesse no desenvolvimento de estratégias para minimizar danos em tecidos de indivíduos portadores de esclerose múltipla, estratégias estas que incluem drogas como talidomida, pentoxifilina, e inibidores da fosfodiesterase, bem como proteínas recombinantes, incluindo receptores solúveis de TNF- $\alpha$  (HAUSER *et al.*, 1995). A administração de TNF- $\alpha$  pode promover autotolerância, no sentido de que

isto previne o desenvolvimento de doenças que levam à síndromes autoimunes (JACOB, 1992)

Estudos clínicos têm sido realizados em pacientes com doenças inflamatórias e não infecciosas tal como a artrite reumatóide, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$ . Esses estudos já demonstraram a eficácia em relação ao bloqueio da citocina em doenças autoimunes, sendo que, no futuro, esta estratégia poderá complementar o uso das drogas imunossupressoras atualmente utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias (EIGLER *et al.*, 1997).

IMAGAWA *et al.* (1990), investigaram o efeito de anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-LT- $\alpha$  em camundongos singênicos submetidos ao transplante cardíaco. O uso profilático desses anticorpos, prolongou a sobrevivência do enxerto, sem qualquer imunossupressão. Por outro lado, a administração de TNF- $\alpha$  purificado, acelerou o tempo de rejeição.

Muitos investigadores têm relatado o aumento da concentração de TNF- $\alpha$  no plasma de receptores durante a rejeição aguda de coração, pulmão, rim, fígado e outros aloenxertos, em humanos. Além disso, quantidades aumentadas de TNF- $\alpha$  e seu mRNA têm sido encontradas em enxertos de rins, fígado e coração humanos rejeitados, infiltrando células e endotélio. Estes fatos sugerem que o TNF- $\alpha$  desempenha um importante papel nas patogêneses de rejeição em pacientes transplantados (SAHOO *et al.*, 2000).

Muitos estudos têm relatado uma associação entre variantes alélicas do TNF e rejeição, embora estes achados sejam controversos (KIMBALL & REID, 2002).

TNF- $\alpha$ , similarmente ao IFN- $\gamma$ , pode provocar rejeição não somente pela ação direta no aloenxerto, mas também por intensificar a expressão de antígenos HLA (PFIZENMAIER *et al.*, 1987).

A expressão do nível da proteína TNF- $\alpha$  é crítica para a determinação do nível de infiltrado celular no enxerto, interferindo na ativação das defesas do hospedeiro. O papel de TNF- $\alpha$  como mediador da rejeição humoral é pouco definido, embora tenha sido descrito sua participação como fator de crescimento para linfócitos B humanos (TURNER *et al.*, 1995; HAUSER *et al.*, 1997).

A rejeição aguda, com TNF- $\alpha$  desempenhando um papel central, é bem controlada por agentes imunossupressores, tais como ciclosporina e tacrolimus que afetam diretamente a ativação gênica de TNF- $\alpha$  (HUTCHINSON *et al.* 1999).

## 2.2 REJEIÇÃO

### 2.2.1 Definição

Rejeição é um processo de destruição do órgão e/ou tecido transplantado iniciado e dirigido contra antígenos estranhos, próprios do enxerto (NORONHA & SAMPAIO, 1997).

### 2.2.2 Tipos

A rejeição tem sido dividida em três tipos principais: hiperaguda, aguda e crônica. Esta última, atualmente denomina-se nefropatia crônica do enxerto.

Para se ter um padrão internacional e único quanto ao tipo de rejeição de transplantes renais, um grupo de especialistas criou nomenclatura e classificação oficiais (classificação de Banff). É com base nestas definições que o pós-transplante de um paciente é avaliado (NORONHA & SAMPAIO, 1997).

#### 2.2.2.1 A rejeição hiperaguda

A **rejeição hiperaguda** ocorre muito rapidamente (via de regra, nas primeiras 72 horas) em pacientes que possuem anticorpos pré-formados contra o enxerto. Anticorpos anti-HLA são induzidos por transfusões sanguíneas prévias, múltiplas gestações ou pela rejeição de um transplante anterior. Além disso, os anticorpos

dirigidos aos grupos sanguíneos do sistema ABO podem provocar uma rejeição hiperaguda. Os anticorpos pré formados fixam complemento e estes danificam as células endoteliais dos vasos sanguíneos. Este dano permite o extravasamento de células e fluidos, promovendo a agregação plaquetária que bloqueia a microvasculatura, privando o enxerto de um suprimento sanguíneo adequado (ROITT *et al.*, 2003).

#### 2.2.2.2 A rejeição aguda

A **rejeição aguda** se manifesta em poucos dias ou semanas após o transplante e resulta da ativação primária de células T e do consequente desencadeamento de vários mecanismos efetores. Se um transplante é realizado em um indivíduo previamente sensibilizado aos antígenos do enxerto, ocorre uma reativação secundária das células T, resultando em uma resposta de rejeição acelerada mediada por células (ROITT *et al.*, 2003).

A resposta de rejeição aguda envolve reações inflamatórias inespecíficas, bem como a ativação de mecanismos celulares e humorais, caracterizando uma resposta do receptor contra o aloenxerto. Este processo envolve a produção de citocinas derivadas de leucócitos, tais como IL-2, FN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e LT- $\alpha$  (NORONHA & SAMPAIO, 1997).

#### 2.2.2.3 Nefropatia crônica do enxerto

Dependendo do grau de disparidade entre doador e receptor e do uso de agentes imunossupressores, a rejeição do enxerto pode ser um processo lento, levando de alguns meses a anos para se manifestar. As paredes dos vasos no enxerto tomam-se espessas e eventualmente bloqueadas. Essa é a **rejeição crônica** que pode ser resultante de várias causas diferentes, como uma rejeição de baixo grau mediada por células, ou deposição de anticorpos ou de complexos antígeno-anticorpo no tecido

enxertado, que por sua vez danificam ou ativam as células endoteliais de revestimento dos vasos e desencadeiam respostas de reparo inadequadas (ROITT *et al.*, 2003).

Sua histopatologia consiste em aterosclerose, lesões e esclerose glomerulares, fibrose intersticial e dentre outros, a atrofia tubular. O processo é acompanhado clinicamente de aumento dos níveis séricos de creatinina, hipertensão arterial e graus diversos de proteinúria. É importante a confirmação histológica para eliminar outras causas como complicações cirúrgicas, doença renal recorrente, rejeição aguda, etc (NORONHA & SAMPAIO, 1997).

A etiologia deste tipo de rejeição parece ser multifatorial, abrangendo os seguintes principais fatores de risco: histoincompatibilidade, frequência e intensidade de episódios de rejeição aguda, tempo de isquemia fria, infecções, idade do doador e do receptor, anormalidades lipídicas no receptor. A rejeição crônica representa um estágio final de repetidos surtos de rejeição aguda, que indicam uso de regimes inadequados ou insuficientes de imunossupressão (NORONHA & SAMPAIO, 1997).

A maioria das células observadas no enxerto no pós-transplante são linfócitos, e 4-7 dias depois aparecem outros tipos celulares como monócitos-macrófagos, neutrófilos e polimorfonucleares. Apesar disto há evidências de que a rejeição precoce do tecido sólido está associada à presença de linfócitos com atividade citotóxica-direta (OPPENHEIM & RUSCETTI, 2000).

### 2.2.3 Citocinas e a fisiologia da rejeição/ aceitação do aloenxerto

O sistema imune é regulado pela liberação de citocinas as quais influenciam na ativação, diferenciação e função celular (HUTCHINSON *et al.*, 1998).

A resposta imune dirigida a órgãos e tecidos transplantados é complexa, e depende, dentre outros fatores, do grau de similaridade dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) entre doador e receptor de órgãos, da sensibilização prévia do receptor aos aloantígenos, e da terapia imunossupressora empregada no período pós-transplante (NORONHA & SAMPAIO, 1997).

Citocinas desempenham um papel central no aumento e supressão dos processos imunes envolvidos no transplante (JACKSON *et al.*, 2001), regulando a rejeição e a aceitação dos aloenxertos. Embora seja relativamente fácil a detecção das citocinas ou de seu mRNA em tecidos transplantados, o problema é determinar se níveis elevados de citocinas estão presentes como uma consequência da rejeição ou se a rejeição é uma consequência da alta produção de uma citocina promovendo a resposta ao enxerto (HUTCHINSON *et al.*, 1998).

Há uma variação interindividual na produção de citocinas. Existe uma diferença de 10 vezes entre indivíduos "altos" e "baixos" produtores de IFN- $\gamma$  e IL-10, por exemplo, quando se comparam os níveis séricos ou plasmáticos destas citocinas, as quais são conhecidas por desempenharem importantes papéis pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, respectivamente. Similamente, existem "altos" e "baixos" produtores de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , o qual promoveria dano do aloenxerto (HUTCHINSON *et al.*, 1998).

Os dados analisados por Daniel *et al.* (1995) permitiu-os sugerir que medições plasmáticas de citocinas podem definir o risco de rejeição e infecção em pacientes transplantados renais.

O genótipo alto produtor de TNF- $\alpha$  está mais fortemente relacionado à rejeição aguda. Em receptores de coração e rim, HLA-DR compatíveis, 70-80% dos episódios de rejeição aguda ocorrem em pacientes com genótipo alto produtor de TNF- $\alpha$ . Entretanto, nem todo paciente com genótipo alto produtor de TNF- $\alpha$  rejeitará o enxerto, presumivelmente devido ao efeito da imunossupressão (HUTCHINSON *et al.*, 1999).

É de particular importância a observação de que a rejeição aguda é mais freqüente em receptores com genótipo alto produtor de TNF- $\alpha$  combinado ao genótipo baixo produtor de IL-10. Em outras palavras, onde a alta produção de uma citocina inflamatória não é contrabalançada pela produção de uma citocina anti-inflamatória (HUTCHINSON *et al.*, 1998).

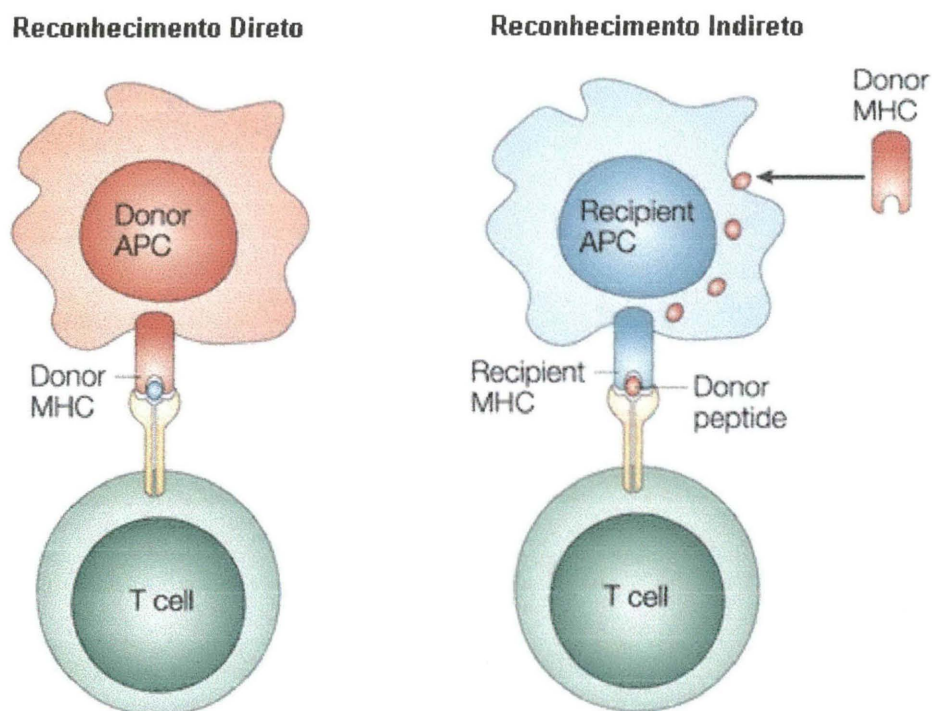
A rejeição do aloenxerto é um processo complexo que envolve uma bateria de células e moléculas. A chave para este processo complexo, entretanto, é a ativação de células T CD4+ que são as principais mediadoras da resposta imune adaptativa à

aloenxertos. As moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) são os antígenos mais potentes envolvidos na rejeição do aloenxerto (SHIRWAN, 2004).

#### 2.2.4 Vias do aioresconhecimento

As células T reconhecem aloantígenos por duas diferentes vias, conhecidas como vias direta e indireta (FIGURA 1). Durante o aioresconhecimento direto, o qual é observado nos transplantes, células T reconhecem moléculas MHC alogênicas intactas (junto com peptídeos endógenos ligados) presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC's) do doador. Durante o aioresconhecimento indireto, o qual é análogo à resposta de célula T a antígenos protéicos, aloantígenos são reconhecidos como peptídeos lineares no contexto das moléculas MHC de classe II do receptor após estes terem sido processados e apresentados pelas APC's do receptor (BRADLEY *et al*, 2002). Embora o papel exato desta via na imunidade do aloenxerto não seja bem estabelecido, há evidências crescentes na literatura permitindo sugerir o papel crítico que o reconhecimento indireto pode desempenhar na rejeição crônica (SHIRWAN, 2004).

FIGURA 1: AS VIAS DO ALORECONHECIMENTO DE ANTÍGENOS



FONTE: BRADLEY *et al*, 2002

A aloresposta direta à moléculas MHC intactas do doador é assegurada por células T, as quais são policlonais (ou seja, envolve a ativação de vários clones de células T) e dirigidas contra uma variedade de antígenos, produzindo uma resposta vigorosa que conduz à rejeição do enxerto. Esta resposta é altamente sensível ao tratamento por drogas imunossupressoras, incluindo a ciclosporina A. A aloresposta indireta é oligoclonal e envolve poucos peptídeos antigênicos dominantes no MHC do doador. Em contraste, o aloreconhecimento indireto é conhecido por ser pouco sensível ao bloqueio pela ciclosporina A. É provável que os tipos de resposta direta e indireta desempenhem diferentes papéis na fisiologia do processo de rejeição. Respostas de células T que ocorrem via aloreconhecimento direto desempenham um papel crítico durante a fase precoce da rejeição aguda pela sensibilização do hospedeiro aos antígenos do enxerto. Alternativamente, uma vez que a sensibilização tenha ocorrido, o



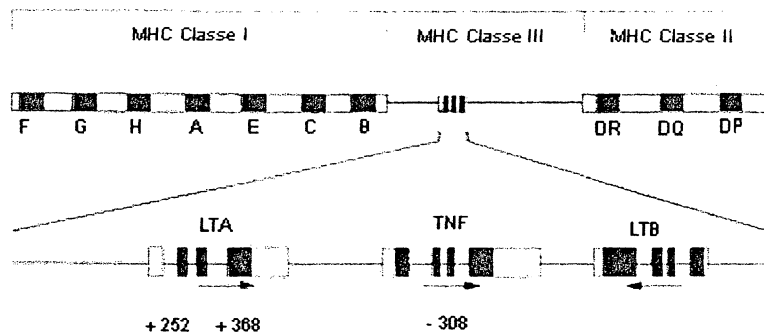
tipo de aloresposta indireta pode tornar-se predominante e, presumivelmente, represente a força dirigente na destruição dos tecidos transplantados. Em conclusão, enquanto a aloresposta indireta talvez não seja determinante no início da sensibilização de células T à aloantígenos in vivo, ela pode entretanto desempenhar um papel chave no processo de rejeição local do enxerto. Além disso, os estudos têm mostrado forte evidência circunstancial indicando que respostas secundárias de células T pela via de aloreconhecimento indireta difundem novos determinantes MHC do doador e antígenos tecido-específicos. É provável que este fenômeno desempenhe um importante papel nas rejeições tardia e crônica, uns dos principais obstáculos da aceitação do aloenxerto a longo prazo no transplante clínico (BENICHOU, 1999).

A recente demonstração do envolvimento do aloreconhecimento indireto na rejeição do enxerto sugere que os mecanismos associados com a fisiologia da rejeição do enxerto sejam revistos. Esta claro que ambos os tipos direto e indireto de aloreconhecimento participam nas respostas de células T à antígenos do doador e contribuem para a rejeição do enxerto. Entretanto, a dicotomia entre essas duas vias tem levantado uma questão que é essencial para os imunologistas: qual é a relativa contribuição de cada tipo de aloresposta na rejeição de um enxerto (BENICHOU, 1999).

## 2.3 OS GENES *TNF* E *LTA*

### 2.3.1 Estrutura gênica

Os genes que codificam o  $TNF-\alpha$  e  $LT-\alpha$  estão intrinsecamente ligados (FIGURA 2) e estão localizados na região de classe III do Complexo principal de Histocompatibilidade (MHC), no braço curto do cromossomo 6 (NEDWIN, 1985).

FIGURA 2: LOCALIZAÇÃO DOS GENES *TNF* E *LTA*

FONTE: The Journal of Rheumatology, disponível em <http://www.jrheum.com/subscribers/01/06/1203.htm>

Alelos de *TNF* e *LTA* estão em forte desequilíbrio de ligação com alelos HLA de classe I e II, bem como com outros alelos na região do MHC, sendo possível que defeitos estruturais e regulatórios nestes genes contribuam para a patogênese de doenças associadas ao HLA (MAKHATADZCA, 1998).

A localização dos genes *TNF* e *LTA* *em tandem*, no MHC, tem conduzido à idéia de que os locos dos referidos genes devem ter um papel importante na associação do HLA e várias doenças autoimunes (VERJANS *et al.*, 1992), particularmente naquelas onde o  $TNF-\alpha$  foi associado com o início e manutenção da resposta inflamatória, tal como artrite reumatóide, malária, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM) (JACOB, 1990; MESSER *et al.*, 1991; POCOIT *et al.*, 1993).

### 2.3.2 Variantes polimórficas e sua influência na transcrição

O grupamento gênico *TNF* contém muitos polimorfismos incluindo microsatélites e polimorfismos de substituição de um único nucleotídeo (SNP's) (HAJEER & HUTCHINSON, 2001).

Variantes polimórficas nos genes *TNF* (que codifica a proteína TNF- $\alpha$ ) e *LTA* (que codifica a proteína LT- $\alpha$ ) foram descritas por vários investigadores, e estas têm sido associadas com o nível de produção de proteínas.

WILSON *et al.* (1992) identificaram variantes polimórficas de transição localizadas na posição -308 da região promotora de TNF e definiram dois alelos: (\*-308G) e (\*-308A). O alelo menos comum (\*-308 A), é caracterizado por uma adenina na posição -308 da região promotora de *TNF* e tem sido relacionado com alta produção de TNF- $\alpha$  (JACOB *et al.*, 1990; ABRAHAM *et al.*, 1993; POCOIT *et al.*, 1993).

Quanto ao gene *LTA*, este apresenta um polimorfismo de restrição que está localizado no íntron I (WEBB & CHAPLIN, 1990; ABRAHAM *et al.*, 1991) (posição +252) (WATTAVIDANAGE *et al.*, 1999), o qual define os alelos: (\*252G) contendo o sítio de restrição NcoI e (\*252A), definido pela ausência do sítio de restrição NcoI. O alelo (\*252A) está associado com o aumento na produção de LT- $\alpha$  em linfócitos T sob estimulação com fitohemaglutinina. Apesar da grande variação individual na produção de LT- $\alpha$ , níveis mais altos foram observados em indivíduos portadores do alelo (\*252A). Em todos os genótipos em que o alelo (\*252A) encontra-se em homozigose, o nível de LT- $\alpha$  em sobrenadantes de cultura celular está diretamente correlacionado com a quantidade de RNA<sub>m</sub> de *LTA* (MESSER *et al.*, 1991).

Duas outras variantes polimórficas foram evidenciadas no íntron I do gene *LTA* (posição +368) (WATTAVIDANAGE *et al.*, 1999), mas até o momento não se pôde relacioná-las com o nível de produção da citocina. Trata-se de um polimorfismo de restrição associado à enzima AspHI, caracterizando dois alelos: (\*368C) e (\*368G) (FERENCIK *et al.*, 1992; ABDALLAH *et al.*, 1999).

Alguns loci polimórficos parecem alterar substancialmente a produção de citocinas, entretanto, a maioria deles parece ter pouca ou nenhuma influência na produção e expressão de citocinas. Poucos polimorfismos levam a substituições de aminoácidos dentro de regiões exônicas. A maioria dos polimorfismos encontrados nos genes das citocinas, e de seus receptores, são localizados em regiões promotoras, intrônicas e 3' não traduzidas. (KEEN, 2002).

O polimorfismo em região promotora pode afetar a ligação de fatores de transcrição e conseqüentemente aumentar ou diminuir a produção de mRNA e desse modo regular a produção de citocinas (GEORGE et al., 2001). Polimorfismos na região promotora podem interromper ou abolir elementos regulatórios da transcrição, relevantes nas vias de transdução de sinais. Mudanças de seqüências em regiões não traduzidas do gene podem afetar sua expressão e função. Variações intrônicas podem afetar seqüências intensificadoras/ silenciadoras e certos polimorfismos nessas regiões podem alterar elementos ligados a fatores estruturais de transcrição (KEEN, 2002).

Foi demonstrado, em vários estudos, que os alelos polimórficos na posição -308 do gene *TNF* afetam a ligação dos fatores de transcrição na sua região promotora em linhagens de linfócitos e monócitos, após estimulação com vários indutores de síntese de  $TNF-\alpha$ . A produção de  $TNF-\alpha$  por células sanguíneas mononucleares em indivíduos normais, estimuladas *in vitro* com LPS (lipopolissacarídeo), permite classificá-los em altos e baixos produtores de  $TNF-\alpha$ . Esta variação na produção, foi associada com variantes alélicas da região promotora -308, sendo o alelo (\*-308 G) caracterizado como baixo produtor e (\*-308 A) como alto produtor dessa citocina (HUTCHINSON et al., 1999).

Indivíduos (-308 AA) têm um maior nível circulante de  $TNF-\alpha$  do que os homozigotos (-308 GG). Além disso, portadores do alelo (\*-308 A) têm um pior prognóstico no que se refere às doenças infecciosas tal como a malária e leishmaniose. Estas observações são sugestivas do papel das variantes polimórficas na posição -308 do *TNF* no que diz respeito à alteração dos níveis de expressão, possivelmente agindo como um fator de susceptibilidade genética em certas doenças autoimunes e infecciosas. Vários pesquisadores têm investigado o significado funcional das variantes polimórficas na posição -308 do *TNF* a fim de se determinar: 1) se estas variantes afetam a ligação de fatores de transcrição à região promotora do gene, e 2) os mecanismos envolvidos na expressão do *TNF* (ABRAHAM & KROEGER, 1999).

Constatou-se que a expressão do *TNF* é regulada nos níveis transcricional e traducional. Durante mais de duas décadas, vários estudos tentaram demonstrar o mecanismo de expressão deste gene. Como muitas outras citocinas, a produção de

*TNF- $\alpha$*  pode ser detectada após a ativação de vários tipos celulares (incluindo macrófagos e linfócitos T e B) por agentes mitogênicos. Entretanto, um aspecto distingue *TNF- $\alpha$*  de outras citocinas: sua produção pode atingir altos níveis em resposta a um estímulo. Endotoxinas tais como LPS induz uma resposta acentuada de *TNF- $\alpha$*  por macrófagos em um curto período de tempo, podendo levar ao choque letal (MAKHATADZA, 1998).

O nível de expressão do *TNF* tem sido correlacionado com o genótipo HLA, em particular com alelos HLA-DR. Esses dados sugerem que a expressão do *TNF* depende de variações polimórficas em desequilíbrio de ligação com marcadores HLA (D'ALFONSO *et al.*, 1994).

Em humanos, a produção de *TNF- $\alpha$*  está relacionada ao alotipo MHC de classe II. Bendtzen (1994) encontrou que humanos DR2<sup>+</sup> produzem significativamente menos *TNF- $\alpha$*  que os DR2<sup>-</sup>. Os variantes HLA DR3, DR1, DR4 e DR7 também têm sido associados com menor produção de *TNF- $\alpha$*  (Pocoit *et al.*, 1993; Bendtzen *et al.*, 1998).

Esses achados foram confirmados e extendidos por Jacob (1992). Neste caso, linfócitos de sangue periférico ou monócitos enriquecidos de indivíduos DR2<sup>-</sup> e DQw1<sup>+</sup> foram invariavelmente baixo produtores, enquanto que pacientes DR3<sup>+</sup> e DR4<sup>+</sup> foram alto produtores de *TNF- $\alpha$* . Estas observações levantam a possibilidade de que um gene *TNF* "desregulado" estaria envolvido no desenvolvimento de doenças autoimunes (JACOB, 1992).

Variações na produção de *TNF- $\alpha$*  após vários estímulos em indivíduos saudáveis, usando-se técnicas de cultura em sangue total, podem explicar predisposições ao desenvolvimento de certos fenótipos ou complicações em infecções e doenças imuno-inflamatórias, tais como a doença de Crohn e hanseníase (LOUIS *et al.*, 1998).

A influência da variação genética dos genes *TNF* e seus efeitos na transcrição permanecem em controvérsia. Do ponto de vista genético, o que se constata é que esta variação interindividual determina parcialmente a produção de citocinas. Outras variantes polimórficas no mesmo gene ou em outros, provavelmente contribuem para a

transcrição. Sendo assim, torna-se difícil atribuir o fenótipo de "alto" e "baixo" produtor para cada alelo (HALDAR *et al.*, 1999).

Devido a produção de TNF- $\alpha$  estar sendo implicada como um fator importante, tanto na regulação imune quanto na resposta inflamatória, o polimorfismo no locus *TNF* é considerado uma possível base genética para diferentes prognósticos de doenças (SAHOO *et al.*, 2000).

### 3 OBJETIVOS

Em uma amostra composta por pacientes renais e controles, pertencentes ao banco de dados do LiGH (Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná), pretende-se:

- Estimar as distribuições alélicas, genotípicas e fenotípicas dos genes *TNF*, na posição -308 e *LTA*, nas posições 252 e 368.
- Investigar a possível associação destes genes com a predisposição em desenvolver doenças renais, episódios de rejeição aguda e infecções pós-transplante.
- A partir destes dados compreender a relevância clínica dos genes em questão no prognóstico do aloenxerto renal.
- Buscar subsídios para estruturar e redigir um trabalho científico com intuito de obter publicação em revista indexada.

#### 4 JUSTIFICATIVA

A resposta aloimune induzida por antígenos histoincompatíveis é um fenômeno complexo e envolve mecanismos tanto da resposta inata quanto da adaptativa. É também modificada por vários fatores imunomoduladores, dentre eles estão as citocinas, as quais desempenham um importante papel na imunomodulação (PETRÁNYI, 2002).

O polimorfismo das citocinas tem sido implicado como um fator de risco em inúmeros estudos de transplantes de órgãos sólidos, além do efeito da incompatibilidade HLA (KEEN, 2002).

Trabalhos recentes apontam a relevância clínica do monitoramento contínuo da produção de citocinas pelo receptor, após o transplante renal. Sabe-se, por exemplo, que o aumento da produção de citocinas do tipo Th1 após o transplante está associado com a rejeição do aloenxerto, enquanto que a sua diminuição está associada com a tolerância. O aumento dos níveis de citocinas do tipo Th2, por outro lado, seja pela ação direta ou por inibição da expressão de citocinas do tipo Th1, tem sido relatado por promover tolerância (BASAK *et al.*, 2003).

A resposta imune é regulada por um conjunto dessas citocinas (incluindo fatores de crescimento), e diferentes indivíduos podem ser classificados como “altos” e “baixos” produtores de citocinas. A investigação da base genética dessas diferenças mostra que essa variação de produção entre indivíduos baseia-se em variantes alélicas relacionadas aos genes que codificam as citocinas (POOLE *et al.*, 2001).

Embora existam evidências de que o polimorfismo dos genes das citocinas esteja associado com as variações das quantidades de produção dessas proteínas, o papel exato desses polimorfismos na rejeição do aloenxerto permanece incompreendido (CARTWRIGHT *et al.*, 2001).

Tem-se sugerido que o polimorfismo observado nas regiões reguladoras destes genes afeta a sua expressão, influenciando na rejeição ou tolerância. Se o genótipo das citocinas do doador é capaz de influenciar no prognóstico do aloenxerto, então é



plausível que a combinação dos genótipos do doador/ receptor talvez sejam importantes neste processo. Vários estudos têm sido feitos para demonstrar quais genótipos mostram serem significantes nesse sentido; a fim de que se possa, conhecendo o perfil de citocinas da dupla, inferir um protocolo personalizado de imunossupressão (POOLE *et al.*, 2001).

Atualmente, as citocinas vêm sendo utilizadas com propósitos terapêuticos no tratamento de muitos distúrbios inflamatórios (como infecções, neoplasias, doenças autoimunes, etc). Tal estratégia consiste em modificar a produção endógena de citocinas e, por essa razão, o conhecimento detalhado da sua complexa rede de interações torna-se clinicamente relevante. Conhecendo-se os modos pelos quais a natureza regula a interação das citocinas surgiriam estratégias terapêuticas mais específicas de intervenção, o que auxiliaria no monitoramento de muitas doenças (BENDTZEN, 1994).

Infecções são umas das causas que conduzem à disfunção precoce do aloenxerto e podem contribuir para a falha do mesmo após o transplante. Diferenciar infecção de rejeição pode ser desafiante (KIMBALL & REID, 2002). O diagnóstico precoce e o tratamento da ativação imune podem prevenir o dano do enxerto. Para a aplicação clínica do monitoramento de citocinas é essencial uma diferenciação entre ativação imune devido à infecção e ativação imune devido à rejeição (DANIEL *et al.*, 1995).

Esta preocupação tem alimentado os esforços em identificar marcadores para acelerar o diagnóstico e o início da terapia apropriada. TNF parece ser particularmente relevante na patogênese e prognóstico de infecção e talvez seja útil como um biomarcador de reações imunológicas para doenças. Tanto TNF- $\alpha$  quanto TNF- $\beta$  (atualmente LT- $\alpha$ ), podem conferir uma base genética para a variabilidade na produção destas citocinas, bem como na resposta interindividual à doenças (KIMBALL & REID, 2002).

Com base nestas evidências espera-se, através deste trabalho, compreender o efeito sinérgico das citocinas no prognóstico e monitoramento de prováveis episódios de rejeição aguda e infecções pós-transplante renal.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os indivíduos que compuseram as amostras investigadas neste trabalho fazem parte de um banco de dados pertencente ao Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná (LIGH).

A amostra paciente constitui-se de 49 indivíduos predominantemente caucasóides, sendo 24 mulheres e 25 homens. Todos os indivíduos desta amostra foram submetidos ao transplante renal, os quais foram realizados no período entre 1996 e 1999 na Unidade de Transplante Renal do Hospital Evangélico de Curitiba.

Os dados demográficos e clínicos da amostra paciente foram obtidos através da análise de seus prontuários. A partir deles foram levantados dados como sexo do receptor, sua doença de base, idade na época do transplante, tipo do doador (se cadáver, vivo relacionado ou não), compatibilidade HLA da dupla (doador x receptor), terapia imunossupressora administrada, episódios de rejeição, infecções pós-transplante, entre outros.

A amostra controle constitui-se de 42 homens e 42 mulheres normais, também predominantemente caucasóides.

As tipagens genéticas, tanto dos pacientes quanto dos controles, referentes às posições investigadas foram previamente realizadas e fornecidas pelo LIGH.

### 5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas as frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas (quando possível) para todos os genes em questão, por contagem direta dos alelos, através da fórmula:

$$x = n/2N^*$$

Onde,  $x$  = frequência relativa do alelo

$n$  = frequência absoluta do alelo

$N$  = número total de indivíduos

\* ou  $N$ , para o cálculo das frequências genotípica e fenotípica

A título de verificação as mesmas foram posteriormente calculadas utilizando o software ARLEQUIN.

Para o cálculo das frequências fenotípicas, os genótipos foram agrupados em alto e baixo produtores, de acordo com o nível de produção de citocinas (QUADRO 1).

QUADRO 1 - POSSÍVEIS FENÓTIPOS E RESPECTIVOS GENÓTIPOS DE *TNF* E *LTA*

Citocina	Genótipo	Fenótipo
TNF- $\alpha$ (-308)	AA	Alto produtor
	AG	Alto produtor
	GG	Baixo produtor
LT- $\alpha$ (+252)	GG	Baixo produtor
	AA	Alto produtor
	GA	Baixo produtor
LT- $\alpha$ (+368)	GG	-----
	CC	-----
	CG	-----

As diferentes frequências foram comparadas através do teste do  $\chi^2$ , utilizando-se o software Microstat. Valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados significativos.

Quando foi necessário comparar dados relativos à média utilizou-se o teste  $t$  de significância ou de student.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS

TABELA 1 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS GENES TNF-308, LTA+252 E LTA+368 DAS AMOSTRAS PACIENTE E CONTROLE

Genótipos	Fenótipos	Frequências Alélicas (%)		Controles (Total = 84) n (%)	Pacientes (Total = 49) n (%)	Valor de P
		Controles	Pacientes			
<b>TNF*-308</b>						
G/G	baixo produtor	G = 86,90	G = 90,82	64 (76,19)	41 (83,67)	0,3072
G/A	alto produtor	A = 13,10	A = 9,18	18 (21,43)	7 (14,29)	0,3091
A/A	alto produtor			2 (2,38)	1 (2,04)	0,6327
<b>LTA*252</b>						
G/G	baixo produtor	G = 27,98	G = 36,73	6 (7,14)	7 (14,29)	0,1809
G/A	baixo produtor	A = 72,02	A = 63,27	35 (41,67)	18 (36,73)	0,5752
A/A	alto produtor			43 (51,19)	24 (48,98)	0,8057
<b>LTA*368</b>						
G/G		G = 64,29	G = 66,33	35 (41,67)	22 (44,90)	0,7164
C/G		C = 35,71	C = 33,67	38 (45,24)	6 (12,24)	0,8873
C/C				11 (13,09)	21 (42,86)	0,7898

FONTE: LIGH

NOTA: Dados trabalhados pelo autor

De acordo com os resultados apresentados na tabela 1 não foram observadas diferenças significativas nas distribuições dos alelos e dos genótipos, quando comparadas as amostras pacientes x controles.

Os genótipos *LTA* na posição +252 foram agrupados de acordo com o fenótipo para a produção das correspondentes citocinas, de acordo com Kimball & Reid (2000). Hutchinson *et al* (1998) dividiu os fenótipos *TNF* na posição -308 em alto produtor, baixo produtor e produtor intermediário. Entretanto, devido ao fato do número de indivíduos homocigotos para o locus (\*308A) ter se apresentado pouco representativo (n=1 na amostra paciente e n=2 nos controles) estes foram unidos aos heterocigotos

(produtores intermediários) os quais foram considerados “alto produtores” em relação aos indivíduos homocigotos para o locus (\*252G).

As freqüências fenotípicas podem ser observadas nas tabelas 2 e 3, respectivamente. As variantes polimórficas do gene *LTA* na posição +368 ainda não foram relacionadas, na literatura, à um determinado fenótipo. Por esta razão, esta posição não estará incluída nas próximas análises.

TABELA 2 - FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS REFERENTES AO GENE *TNF* NA POSIÇÃO -308

FENÓTIPO	PACIENTE (%)	CONTROLE (%)
Alto produtor	16,33	23,81
Baixo produtor	83,67	76,19

FONTE: Pesquisa de campo

Como pode ser observado na tabela 2, cerca de 83% da amostra paciente apresentou o fenótipo baixo produtor comparado com 76% do mesmo genótipo na amostra controle ( $p=0,3072$ ). As freqüências dos genótipos alto e baixo produtores foram similares em ambos os grupos. Estes dados estão de acordo com os trabalho de Sankaran *et al.* (1999).

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS REFERENTES AO GENE *LTA* NA POSIÇÃO +252

FENÓTIPO	PACIENTE (%)	CONTROLE (%)
Alto produtor	48,98	51,19
Baixo produtor	51,02	48,81

FONTE: Pesquisa de campo

Da mesma forma, quando comparamos os fenótipos alto e baixo produtores relacionados aos genes *LTA*, na posição +252, (TABELA 3) ambas as amostras apresentaram distribuição semelhante ( $p=0,8057$ ).

Dos 49 indivíduos que compunham a amostra paciente 41 (83,67%) apresentaram o fenótipo baixo produtor de TNF- $\alpha$  e 25 (51,02%) foram baixo produtores de LT- $\alpha$ . Enquanto que 8 (16,33%) indivíduos tiveram um fenótipo alto produtor para TNF- $\alpha$  e 24 (48,98%) foram alto produtores de LT- $\alpha$ . Essas frequências não foram estatisticamente diferentes do grupo controle.

## 6.2 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *TNF* E *LTA* E DOENÇAS RENAIIS

Admitindo-se que a insuficiência renal observada na amostra paciente, independentemente de sua doença de base, poderia estar relacionada a processos inflamatórios dependentes das citocinas codificadas por estes genes, era plausível esperar que o fenótipo baixo produtor estivesse em maior frequência na referida amostra. De acordo com os dados apresentados nas tabelas acima, não foram observadas evidências quanto à existência de genótipos e/ou fenótipos que confirmem proteção ou que determinem a predisposição em desenvolver doenças renais, já que não houve quaisquer genótipos e/ou fenótipos prevalentes em nenhuma das amostras em questão.

### 6.3 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS *TNF* E *LTA* E EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO AGUDA

TABELA 4 - ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *TNF* NA POSIÇÃO -308 E EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO AGUDA

	*-308 GG (↓)	*-308 AA/GA (↑)	
Qualquer rejeição em 1 ano (%)	56,0	25,0	n.s.
Número médio de rejeições em 1 ano	1,65	1	*
Tempo médio da primeira rejeição (dias)	24,95	193,4	n.s.

FONTE: Pesquisa de campo

NOTAS: Sinais convencionais utilizados:

(↓) baixo produtor

(↑) alto produtor

n.s. valores não significativos

\* valores significativos.

TABELA 5 - ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *LTA* NA POSIÇÃO +252 E EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO AGUDA

	*252 GG/GA (↓)	*252 AA (↑)	
Qualquer rejeição em 1 ano (%)	60,0	50,0	n.s.
Número médio de rejeições em 1 ano	1,66	1,42	n.s.
Tempo médio da primeira rejeição (dias)	46,60	48,19	n.s.

FONTE: Pesquisa de campo

Na tabela 4, a análise estatística da comparação entre o número médio de rejeições, nos diferentes fenótipos, resultou em um valor significativo. Como se pode observar na referida tabela, os indivíduos alto produtores tiveram menos episódios de rejeições em relação aos baixo produtores. Ao contrário do que se esperava, já que o fenótipo alto produtor favorece uma condição inflamatória e, portanto, estes indivíduos deveriam ser mais susceptíveis à rejeição. Entretanto, este resultado pode ser questionado devido ao pequeno número de pacientes com o fenótipo alto produtor (n=2 num total de 8 pacientes) que sofreram rejeição.

#### 6.4 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS *TNF* E *LTA* E INFECÇÕES PÓS-TRANSPLANTE RENAL

TABELA 6 - ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *TNF* NA POSIÇÃO -308 E OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO PÓS-TRANSPLANTE

	*-308 GG (↓)	*-308 AA/GA (↑)	
Qualquer infecção no 1º ano (%)	65,71	71,43	n.s.
Número médio de infecções em 1 ano	2,04	1,4	n.s.
Qualquer infecção bacteriana em 1 ano (%)	65,22	40,0	n.s.
Qualquer infecção viral em 1 ano (%)	56,52	80,0	n.s.
Qualquer infecção fúngica em 1 ano (%)	21,74	—	n.s.

FONTE: Pesquisa de campo

Como pode ser observado na tabela 6, a distribuição dos fenótipos na amostra com infecção apresentou-se estatisticamente semelhante, ou seja, não foi evidenciada qualquer relação entre o genótipo *TNF* e a susceptibilidade à infecções pós-transplante. Ao contrário de Sahoo *et al.* (2000) que encontraram associação entre *TNF-α* e a susceptibilidade à infecção em transplante renal.

TABELA 7 - ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *LTA* NA POSIÇÃO +252 E OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO PÓS-TRANSPLANTE

	*252 GG/GA (↓)	*252 AA (↑)	
Qualquer infecção no 1º ano (%)	80,95	52,38	*
Número médio de infecções em 1 ano	2,18	1,55	n.s.
Qualquer infecção bacteriana em 1 ano (%)	70,59	45,45	*
Qualquer infecção viral em 1 ano (%)	70,59	45,45	*
Qualquer infecção fúngica em 1 ano (%)	17,65	18,18	n.s.

FONTE: Pesquisa de campo

NOTA: Para a análise das rejeições, 7 indivíduos foram excluídos da amostra paciente devido à falta de dados nos prontuários dos mesmos.

De acordo com os dados apresentados na tabela 7 pode-se observar a associação entre variantes polimórficas do gene *LTA* e infecções. Aproximadamente



80% dos indivíduos portadores do alelo (\*252G) o qual determina o fenótipo baixo produtor de LT- $\alpha$  apresentaram alguma infecção no primeiro ano após o transplante, contra 52% nos alto produtores ( $p=0,0495$ ). Kimball & Reid (2002) encontraram resultados semelhantes.

Além disso, a análise dos dados mostra uma relação entre o genótipo e susceptibilidade à diferentes patógenos. Os indivíduos baixo produtores parecem ser mais susceptíveis à infecções bacterianas e virais do que os alto produtores. Dentre os indivíduos baixo produtores que tiveram algum tipo de infecção pós-transplante, cerca de 70% tiveram alguma infecção causada por vírus e bactéria, contra aproximadamente 45% nos alto produtores ( $p=0,0278$ ).

Muitas variáveis podem contribuir para esses resultados aparentemente controversos (como os relacionados ao polimorfismo no gene *TNF*), inclusive o pequeno tamanho da amostra e as distribuições étnicas incomuns.

Muito embora, a amostra utilizada neste trabalho seja de origem predominantemente caucasóide, a população brasileira é bastante miscigenada e a diversidade étnica na produção de TNF- $\alpha$  e LT- $\alpha$  tem sido relatada (KIMBALL & REID, 2002; HASSAN *et al.*, 2003)). Padyukov *et al.* (2001) analisaram a frequência dos alelos TNF- $\alpha$  \*-308 em dois diferentes grupos étnicos, chineses e caucasianos, e encontraram diferenças significativas entre as duas populações, sugerindo que diferenças na frequência de alelos de citocinas funcionalmente importantes talvez tenham conseqüências na manifestação e prognóstico de certas doenças em indivíduos de diferentes etnias.

Entretanto, uma variável que tem recebido uma atenção mínima é o potencial impacto da imunossupressão. Estudos usando MMF combinado com inibidores da calcinerina não encontraram nenhuma relação entre o genótipo e os episódios de rejeição. Em contraste, em estudos usando somente inibidores da calcinerina foi descrita uma associação entre o genótipo e a incidência de rejeição (KIMBALL & REID, 2002)

Em indivíduos geneticamente predeterminados a serem baixo produtores de TNF- $\alpha$ , por exemplo, a inibição adicional da produção de TNF- $\alpha$  pela rotina de

imunossupressão talvez seja excessiva, tomando esses indivíduos menos capazes de responder a estímulos infecciosos. Isto sugere que indivíduos com o sítio Nco I talvez se beneficiem com a redução ou retirada precoce da imunossupressão, em especial de agentes como os corticosteróides, os quais são conhecidos inibidores da transcrição de TNF- $\alpha$  (FREEMAN *et al.*, 1999).

Determinar se uma dada variante polimórfica é diretamente responsável por um fenótipo ou se está associada com alguma doença, torna-se difícil quando o gene em questão está situado na região do MHC, devido ao forte desequilíbrio de ligação entre os alelos de genes situados nessa região. Associações entre haplótipos MHC e fenótipos TNF- $\alpha$  podem não ser atribuídas ao próprio gene *TNF*, mas sim à variações presentes em genes ligados ao *TNF*, que direta ou indiretamente regulem a sua expressão. Deste modo é importante mostrar o efeito funcional direto das variantes polimórficas na posição -308, para que se possa interpretar corretamente os estudos de associação relacionados a marcadores *TNF* (HUTCHINSON *et al.*, 1999).

Além disso, para deduzir o papel que o genótipo das citocinas desempenha no prognóstico do enxerto, deve-se considerar um grande número de receptores e as diferenças de protocolos e metodologias de análise entre os centros de transplantes (JACKSON *et al.*, 2001).

## 7 CONCLUSÃO

Vários estudos têm sugerido que, além da disparidade dos alelos HLA, o polimorfismo presente em genes que codificam citocinas também contribuiriam para o prognóstico da função do enxerto e, portanto, a análise adicional deste fator promoveria um maior refinamento na seleção da dupla doador-receptor. A identificação de marcadores diagnósticos de rejeição permitiria uma antecipação dos resultados clínicos e talvez reduzisse a necessidade de biópsia do tecido. Além disso, a análise combinada do genótipo de citocinas e dos níveis de expressão pré e pós-transplante nas células periféricas de receptores talvez seja uma importante pista para compreender a contribuição da resposta imune contra um aloenxerto (MCDANIEL *et al.*, 2003).

No presente trabalho, não foi observada qualquer relação entre o genótipo e a predisposição a doenças renais e episódios de rejeição aguda, mas foi encontrada relação com infecções pós-transplante. Entretanto, em estudos nos quais procura-se investigar a associação entre genótipos e/ou fenótipos dos genes *TNF* e *LTA* com uma determinada condição clínica têm-se observado, freqüentemente, resultados contraditórios.

Muitos pacientes são submetidos à imunossupressão inadequada, ou seja, abaixo ou acima do necessário e, conseqüentemente, podem sofrer rejeição ou efeitos colaterais. Espera-se que o perfil dos genes das citocinas permita predizer quais pacientes são mais suscetíveis à rejeição, requerendo maior imunossupressão e, inversamente, identificar os baixo respondedores os quais podem ser tratados com imunossupressão mínima.

Portanto, uma definição dos genótipos das citocinas pode indicar como receptores responderão a seus transplantes e, dessa forma, delinear um protocolo individual de imunossupressão (HUTCHINSON *et al.*, 1998).

Apesar da habilidade do  $TNF-\alpha$  em mediar uma variedade de funções e exercerem diversos efeitos notáveis no sistema imune, surpreendentemente pouco se

sabe sobre a relevância biológica do  $TNF-\alpha$  para a homeostase do sistema imune *in vivo* (JACOB, 1992).

Uma resposta definitiva para a possível relação entre o genótipo *TNF* e o prognóstico do aloenxerto deve aguardar uma avaliação mais abrangente. Do mesmo modo que a avaliação pré-transplante de receptores pré-sensibilizados propicia uma advertência quanto às complicações pós-transplante, a tipagem molecular da variação alélica do gene *TNF* talvez permita prever a susceptibilidade individual às infecções. Este conhecimento talvez encorage o uso de uma profilaxia mais agressiva ou o uso mais amplo de antibióticos em pacientes geneticamente predispostos às infecções (KIMBALL & REID, 2002).

A elaboração dessa monografia permitiu concluir que as ações sinérgica, redundante e pleiotrópica das citocinas dificultam não só a análise de seus efeitos fisiológicos individuais como também a interpretação de uma possível correlação com qualquer outra variável.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 486p.
- ABDALLAH, A.N.; CUCCHI-MOUILLOT, P.; BITEAU, N.; CASSAIGNE, A.; HARAS, D.; IRON, A. Analysis of the polymorphism of the tumour necrosis factor (TNF) gene and promoter and of circulating TNF-alpha levels in heart-transplant patients suffering or not suffering from severe rejection. **European Journal of Immunogenetics**, v. 26, p. 249-255, 1999.
- ABRAHAM, L.; 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, p. 562-566, 1999.
- BASAK, U.; MITRA, D.K.; PANIGRAHI, A.; GULERIA, S.; AGARWAL, S.; MEHTA, S.N.; DASH, S.C.; MEHRA, N.K. Clinical relevance of monitoring cytokine production following living donor renal transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 35, p. 404-406, 2003.
- BENDTZEN, K. Cytokines and natural regulators of cytokines. **Immunology Letters**, v. 43, p. 111-123, 1994.
- BENDTZEN, K; MORLIN, N.; FORMSGAARD A.; SVENSON, M.; JACOBSEN, B.; ODUM, N.; SVEJGAARD, N. Association between HLA-DR2 and production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 28, p. 559, 1998.
- BENICHO, G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 476-480, 1999.
- BEUTLER, B.; BAZZONI, F. TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 31, p. 216-230, 1998.
- BRADLEY, J.A.; BOLTON, E.M.; PEDERSEN, R.A. Stem cell medicine encounters the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 959-871, 2002.
- CARTWRIGHT, N.H.; KEEN, L.J.; DEMAINE, A.G.; HURLOCK, N.J.; MCGONIGLE, R.J.; ROWE, P.A.; SHAW, J.F.; SZYDLO, R.M.; KAMINSKI, E.R. A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. **Transplant Immunology**, v. 8, p. 237-244, 2001.
- DANIEL, V.; PASKER, S.; WIESEL, M.; CARL, S.; POMER, S.; STAEHLER, G.; SCHNOBEL, R.; WEIMER, R.; OPELZ, G. Cytokine monitoring of infection and rejection in renal transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 27, p. 884-886, 1995.

DE VRIES, R.R.P.; ROOD, J.J. Immunogenetics and Disease. In: KING, R.A.; ROTTER, J.I.; MOTULSKY, A.G. **The Genetic Basis of Common Diseases**, New York: Oxford University Press, 1992, p. 92-114.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunology Today**, v.18, p. 487-492, 1997.

FERENCIK, S.; LINDEMANN, M.; HORSTHEMKE, B.; GROSSE-WILDE, H. A new restriction fragment length polymorphism of the human TNFB gene detected by *Asp*HI digest. **European Journal of Immunogenetics**, v.19, p. 425-430, 1992.

FREEMAN JÚNIOR, R.B.; CAM-LY, T.; MATTOLI, J.; PATEL, K.; SUPRAN, S.; BASILE, F.G.; KRISHNAMURTHY, S.; AIHARA, R.; Tumor necrosis factor genetic polymorphisms correlate with infections after liver transplantation. **Transplantation**, v. 67, p. 1005-1010, 1999.

GEORGE, S.; TURNER, D.; REYNARD, M.; NAVARRETE, C.; RIZVI, I.; FERNANDO, O.N.; POWIS, S.H.; MOORHEAD, J.F.; VARGHESE, Z. Significance of cytokine gene polymorphism in renal transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 33. p. 483-484, 2001.

GRELL, M.; DOUNI, E.; WAJANT, H.; LOHDEN, M.; CLAUSS, M.; MAXEINER, B.; GEORGOPOULOS, S.; LESSLAUER, W.; KOLLIAS, G.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, v. 83, p. 793-802, 1995.

HAJEER, A.H.; HUTCHINSON, I.V. Influence of TNF $\alpha$  gene polymorphisms on TNF $\alpha$  production and disease. **Human Immunology**, v.62, p. 1191-1199, 2001.

HALDAR, N.A.; McLAREN, A.; MARSHALL, S.E.; MORRIS, P.J.; WELSH, K.I. Is Renal Graft Survival Predetermined by the Recipient's Cytokine Profile? **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 289-290, 1999.

HASSAN, M.I.; ASCHNER, Y.; MANNING, C.H.; XU, J.; ASCHNER, J.L. Racial differences in selected cytokine allelic and genotypic frequencies among healthy, pregnant women in North Carolina. **Cytokine**, v.21, p. 10-16, 2003.

HAUSER, S.L. Tumor necrosis factor: immunogenetics and disease. **Annals of Neurology**, v. 38, p. 702-704, 1995.

HAUSER, I.A.; RIESS, R.; HAUSKNECHT, B.; THURINGER, H.; STERZEL, R.B. Expression of cell adhesion molecules in primary renal disease and renal allograft rejection. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 12, p. 1122-1131, 1997.

HUTCHINSON, I.V.; PRAVICA, V.; SINNOT, P.J. Genetic regulation of cytokine synthesis: consequences of acute and chronic organ allograft rejection. **Graft**, v. 1, p. 15-21, 1998.

HUTCHINSON, I.V.; PRAVICA, V.; PERREY, C.; SINNOT, P.J. Cytokine gene polymorphism and relevance to forms of rejection. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 734-736, 1999.

HUTCHINSON, I.V.; TURNER, D.M.; SANKARAN, D.; AWAD, M.R.; SINNOTT, P.J. Cytokine genotypes in allograft rejection: guidelines for immunosuppression. **Transplantation Proceedings**, v.30, p. 3991-3992, 1998.

HUTCHINSON, I.V.; TURNER, D.M.; SANKARAN, D.; AWAD, M.R.; SINNOTT, P.J. Influence of cytokine genotypes on allograft rejection. **Transplantation Proceedings**, v.30, p. 862-863, 1998.

IMAGAWA, D.K.; MILLIS, J.M.; OLTHOFF, K.M.; SEU, P.; DEMPSEY, R.A.; HART, J.; TERASAKI, P.I.; BUSUTTL, R.W. Anti-tumor necrosis factor antibody enhances allograft survival in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 48, p. 345-348, 1990.

JACKSON, A.; PALMER, S.; DAVIS, R.D.; PAPPENDICK, A.; PEARSON, E.; SAVIK, K.; ORMAZA, S.; HERTZ, M.; DACEY, M.; MILLER, L.; REINSMOEN, N.L. Cytokine genotypes in kidney, heart, and lung recipients: consequences for acute and chronic rejection. **Transplantation Proceedings**, v.33, p. 489-490, 2001.

JACOB, C.J. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in autoimmunity: pretty girl or old witch? **Immunology Today**, v. 13, p. 122-125, 1992.

KEEN, L.J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. **Transplant Immunology**, v. 10, p. 143-146, 2002.

KIMBALL, P.; REID, F. Tumor necrosis factor  $\beta$  gene polymorphisms associated with urinary tract infections after renal transplantation. **Transplantation**, v. 73, p. 110-1112, 2002.

KROEGER, K.M.; CARVILLE, K.S.; ABRAHAM, L.J. The -308 tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism effects transcription. **Molecular Immunology**, v. 34, p. 391-399, 1997.

KUBY, J. **Immunology**, 3.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. 664p.

LOUIS, E.; FRANCHIMONT, D.; PIRON, A.; GEVAERT, Y.; SCHAAF-LAFONTAINE, N.; ROLAND, S.; MAHIEU, P.; MALAISE, M.; DE GROOTE, D.; LOUIS, R.; BELAICHE, J. Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 113, p. 401-406, 1998.

MACDANIEL, D.O.; BARBER, W.H.; NGUYAN, C.; RHODES, S.W.; MAY, W.L.; MACDANIEL, L.S.; VIG, P.J.S.; JEMESON, L.L.; BUTKUS, D.E. Combined analysis of cytokine genotype polymorphism and level of expression with allograft function in African-American renal transplant patients. **Transplant Immunology**, v.11, p. 107-119, 2003.

MAK, T.W.; SIMARD, J.J.L. **Handbook of immune response genes**. New York: Plenum Press, 1998. 393p.

MAKHATADZCA, N.J. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. **Human Immunology**, v. 59, p. 571-579, 1998.

MESSER, G.; SPENGLER, U.; JUNG, M.C.; HONOLD, G.; BLOMER, K.; PAPE, G.R.; RIETHMULLER, G.; WEISS, E.H. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: a NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- $\beta$  gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- $\beta$  production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 209-219, 1991.

NEDWIN, G.E.; NAYLOR, S.L.; SAKAGUCHI, A.Y, et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal location. **Nucleic Acids Research**, v.13, p. 6361-6373, 1985.

NORONHA, I.L.; SAMPAIO, S.O. Citocinas e moléculas de adesão. In: NEUMANN, J.; ABBUD, M.; GARCIA, V.D. **Transplantes de Órgãos e Tecidos**, São Paulo: Sarvier, 1997, p. 45-57.

OLD, L.J. Another chapter in the long history of endotoxin. **Nature**, v. 330, p. 602-603, 1987.

OLD, L.J. Tumor necrosis factor. **Scientific American**, v. 258, p. 41-49, 1988.

OLIFF, A. The role of tumor necrosis factor (cachectin) in cachexia. **Cell**, v. 54, p. 141-142, 1988.

OLIVEIRA, G.; XAVIER, P.; MURPHY, B.; NETO, S.; MENDES, A.; SAYEGH, M.H.; GUERRA, L.E. Cytokine analysis of human renal allograft aspiration biopsy cultures supernatants predicts acute rejection. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, p. 417-422, 1998.

OPPENHEIM, J.J.; RUSCETTI, F.W. Citocinas. In: STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLOW, T.G. **Imunologia Médica**, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000, p. 113-130.

PADYUKOV, L.; HAHN-ZORIC, M.; LAU, Y.L.; HANSON, L.A. Different allelic frequencies of several of cytokine genes in Hong Kong Chinese and Swedish Caucasians. **Genes Immunology**, v. 12, p. 280-283, 2001.



- PENNICA, D.; NEDWIN, G.E.; HAYFLIK, J.S.; SEEBURG, P.H.; DERYNCK, R.; PALLADINO, M.A.; KOHR, W.J.; AGGARWAL, B.B.; GOEDDEL, D.V. Human tumor necrosis factor: precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, v. 312, p. 724-728, 1984.
- PETRÁNYI, G.G. The complexity of immune and alloimmune response. **Transplant Immunology**, v.10, p. 91-100, 2002.
- PFEFFER, K. Biological function of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, p. 185-191, 2003.
- PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P.; SCHLUTER, C.; KRONKE, M. Tumor necrosis factor enhances HLA-A, B, C and HLA-DR gene expression in human tumor cells. **The Journal of Immunology**, v. 138, p. 975-980, 1987.
- POCOIT, F.; BRIANT, L.; JONGENEEL, C.V.; MOLVIG, J.; WORSAAE, H.; ABBAL, M.; THOMSEN, M.; NERUP, J.; CAMBON-THOMSEN, A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. **European Journal of Immunology**, v.23, p. 224-231, 1993.
- POLI, F.; BOSCHIERO, L.; GIANNONI, F.; TONINI, M.; SCALAMOGNA, M.; ANCONA, G.; SIRCHIA, G. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism: implications in kidney transplantation. **Cytokine**, v. 12, p. 1778-1783, 2000.
- POOLE, K.L.; GIBBS, P.J.; EVANS, P.R.; SADEK, S.A.; HOWELL, W.M. Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. **Transplant Immunology**, v. 8, p. 259-265, 2001.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6.ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2003. 481p.
- SAHOO, S.; KANG, S; SUPRAN, S.; SALOMAN, R.; WOLFE, H.; FREEMAN, R.B. Tumor necrosis factor genetic polymorphisms correlate with infections after renal transplantation. **Transplantation**, v. 69, p. 880-884, 2000.
- SANKARAN, D.; ASDERAKIS, A.; ASHAF, S.; ROBERTS, I.S.D.; SHORT, C.D.; DYER, P.A.; SINNOT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. **Kidney International**, v. 56, p. 281-288, 1999.
- STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLAW, T.G. **Imunologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 689p.

SHIRWAN, H. **Institute for cellular therapeutics at the University of Louisville.**  
Disponível em: <<http://www.ict.louisville.edu/bench/faculty/shirwan/researche.html>>  
Acesso em: 21 jan. 2004

THOMSON, A.W.; LOTZE, M.T. **The cytokine handbook.**, 4.ed. Academic Press, 2003. v.1, 638p.

TURNER, D.M.; GRANT, S.C.D.; LAMB, W.R.; BRENCHLEY, P.E.C.; DYER, P.A.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I.V. A genetic marker of high TNF- $\alpha$  production in heart transplant recipients. **Transplantation**, v. 60, p. 1113-1117, 1995.

VERJANS, G.M.G.M.; MESSER, G.; WEISS, E.H.; VAN DER LINDEN, S.M.; KIJLSTRA, A. Polymorphism of the tumor necrosis factor region in relation to disease: na overview. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 18, p. 177-187, 1992.

WATTAVIDANAGE, J.; CARTER, R.; PERERA, K.L.R.L.; MUNASINGHA, A.; BANDARA, S.; MCGUINNESS, D.; WICKRAMASINGHE, A.R.; ALLES, H.K.; MENDIS, K.N.; PREMAWANSA, S. TNF $\alpha$ \*2 marks high risk of severe disease during Plasmodium falciparum malaria and other infections in Sri Lankas. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 115, p. 350-355, 1999.

WILSON, A.G.; VRIES, N.; POCOIT, F.; DI GIOVANE, F. S.; VAN DER PUTTE, L.B.A.; DUFF, G.W. Na allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 557-560, 1993.

YANG, L.; LIU, Y. Citokine gene polimorphisms predict acute rejection following renal transplantation. **International Congress Series 1255**, p. 99-100, 2003.