Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Gustavo Milson Fabrício da Silva

Polimorfismo genético de citocinas na população do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2009

Gustavo Milson Fabrício da Silva

Polimorfismo genético de citocinas na população do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S586 Silva, Gustavo Milson Fabricio da.

Polimorfismos genéticos de citocinas na população do Rio de Janeiro / Gustavo Milson Fabrício da Silva. - 2009.
77 f. : il.

Orientador: Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Polimorfismo (Genética) – Teses. 2. Citocinas. 3. População – Aspectos genéticos - Teses. I. Porto, Luís Cristóvão de Moraes Sobrino. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III.Título.

CDU 575.23

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura Data

Gustavo Milson Fabrício da Silva

Polimorfismo genético de citocinas na população do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de março de 2009.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Dra. Ana Hatagima
Instituto Oswaldo Cruz

_____

Prof. Dr. Luís Cristóvão Porto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2009

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem busquei forças nas horas difíceis.

Ao meu orientador, Luis Cristóvão Porto, por me conceder esta oportunidade.

A minha mãe, pelo incentivo e empolgação em todos os momentos.

A minha esposa Kellen, por toda sua paciência, encorajamento e companheirismo.

A TODA minha família, pelo constante apoio: meu pai Francisco, Daniel, Guilherme, Kelly, Carla, Juca, Ilza, Karen, Fred, meus avós Fabrício e Luzanira (*in memorian*).

Aos amigos do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação, que, sem exceção, sempre me animaram a prosseguir: Elizabeth Figueiredo, Mônica, Luciane, Fernanda, Magda, Paulo, Raquel Hilário, Raquel Bernardo, Priscilla, Ernesto, Elizabeth Bittencourt e Josefa.

A Juliana Fernandes Cardoso, pela amizade, apoio, conselhos e sábias sugestões.

A Juliana Motta, que assumiu minhas atividades no laboratório sem reclamar (muito!) para que eu tivesse mais tranqüilidade ao concluir este trabalho.

A Teresa Marques, pela confiança em mim.

Aos amigos da UERJ: Cristiane, Francisco, Paula, Joyce, Bruna e Alexandre.

Aos amigos do Departamento de Histologia e Embriologia: Thaís, Adriana, Jeanine, Samuel, Marcela e Profª Laís Carvalho.

A professora Andréa Monte Alto Costa, por ser minha inspiração desde o início.

Aos amigos da Pós: Sandra, Júlio, Vinícius, Lilian.

A equipe do Banco de Sangue Herbert de Souza do HUPE-UERJ, em especial a Dra. Selma Magalhães Brito e as enfermeiras Gilce e Leylane pela receptividade na acolhida a este projeto.

A Profª Dayse Aparecida da Silva por sua importante contribuição na revisão deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Referência Nacional em Hepatites Virais, em especial a Dra. Jaqueline e a técnica Lucy.

Se, porém, algum de vós necessita de sabedoria, peça-a a Deus, que a todos dá liberalmente e nada lhes censura; e ser-lhe-á concedida.

Tiago 1:5

RESUMO

SILVA, Gustavo Milson Fabrício da. *Polimorfismo genético de citocinas na população do Rio de Janeiro.* 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Citocinas são moléculas que controlam e modulam a atividade de numerosas células por se ligarem a seus receptores específicos. As diferenças observadas na produção de citocinas entre indivíduos podem ser, pelo menos em parte, explicadas pelos polimorfismos genéticos como o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP). Em 181 indivíduos saudáveis não-aparentados da cidade do Rio de Janeiro (região Sudeste - Brasil), nós analisamos os polimorfismos de citocinas em genes que codificam para Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-α), Fator de Crescimento Transformante-beta (TGF-β), Interleucina-10, Interleucina-6 e Interferon-gama (IFN-γ). Reação em cadeia da polimerase utilizando-se iniciadores sequencia-específicos foi realizada com auxílio do kit comercial CytGen (One Lambda Inc. Canoga Park, CA, USA). Ao todo, 8 polimorfismos foram analisados: TNF-α (-308G/A); TGF-β (códon 10C/T, códon 25C/G); IL-10 (-1082A/G, -819T/C, -592A/C); IL-6 (-174C/G) e IFN-γ (+874T/A). Os dados observados foram comparados a três grupos de população de diferentes regiões do Brasil (São Paulo, Paraná e Bahia) e a três populações de outros continentes (Itália, Eslováquia e Negros Norte-Americanos). O teste qui-quadrado foi utilizado para as comparações. Nossa análise da população do Rio de Janeiro mostrou que os as freqüências alélicas em IL-10, IL-6 e IFN-γ são desigualmente distribuídos entre Brancos, Mulatos e Negros ($p<0,05$). A comparação com populações de outras regiões do Brasil revelou que Rio de Janeiro e Bahia possuem freqüências alélicas e genotípicas de TGF-β (códon 25) estatisticamente diferentes ($p=0,004$ e $p=0,002$, respectivamente). Ainda, a freqüência alélica na população do Rio de Janeiro é significativamente diferente quando comparada à população da Itália [IL-6 (-174), $p=0,0092$; e IFN-γ (+874) $p=0,0418$)]; Eslováquia [IL-10(-1082), $p=0,006$; IL-6(-174), $p=0,0002$; e IFN-γ(+874), $p=0,0335$]; e Afro-Americanos [IL-10(-819), $p=0,0446$; IL-6(-174), $p<0,0001$; e IFN-γ(+874), $p<0,0001$]. Adicionalmente, observamos que a diferença na distribuição dos haplótipos em IL-10 (-1082/-819/-592) na população do Rio de Janeiro em comparação com a da Itália ($p=0,0293$) e Afro-Americanos ($p=0,0025$) é significativa. Portanto, concluímos que os polimorfismos em IL-10, IL-6 e IFN-γ estão distribuídos de acordo com a etnia na população do Rio de Janeiro. A população do Rio de Janeiro possui freqüências de polimorfismos diferentes das populações de Bahia, Itália, Eslováquia e Afro-Americanos, mas semelhantes à população de São Paulo/Paraná. Nossas observações poderão ser úteis para futuros estudos e associação entre polimorfismos genéticos de citocinas e doenças na população do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Citocinas. Polimorfismo de um único nucleotídeo. Etnia. População.

ABSTRACT

Cytokines are molecules that control and modulate the activities of numerous target cells via binding to specific receptors. The observed differences in the cytokine production among individuals can be, at least, explained by genetic polymorphisms like single nucleotide polymorphism (SNP). In 181 unrelated healthy Brazilian individuals from Rio de Janeiro City, we investigated the polymorphisms of cytokine genes encoding Tumor Necrosis Factor-alpha (TNFA), Transforming Growth Factor–beta (TGFB), Interleukin (IL)-10, IL-6, and Interferon-gamma (IFNG). Polymerase chain reaction using sequence-specific primers genotyping was performed for these gene cytokines using the avaiable comercial kit CytGen (One Lambda Inc., CA, USA). Eight polymorphisms were tested: TNF-α (-308G/A); TGF-β (códon 10C/T, códon 25C/G); IL-10 (-1082A/G, -819T/C, -592A/C); IL-6 (-174G/C) and IFN-γ (+874T/A). Chi-square test was used for comparisons. Observed data were compared to three other populations from different regions of Brazil (São Paulo, Paraná and Bahia) and three populations of other countries (Italy, Slovakia and North American Blacks). Our analysis from Rio de Janeiro population showed that the alleles frequencies in IL-10, IL-6 and IFN-γ are unevenly distributed among Whites, Blacks and Mulatos ($p<0.05$). The comparison with populations from other regions of Brazil showed that Rio de Janeiro and Bahia have genotypic and allelic frequencies of TGF-β (códon 25) statistically different (p=0,004 and p=0,002, respectively). Also, the allelic frequency in the population of Rio de Janeiro is significantly different when compared to the population of Italy [IL-6 (-174), p=0.0092, and IFN-γ (+874), p=0.0418] ; Slovak [IL-10 (-1082), p=0006; IL-6 (-174), p=0.0002, and IFN-γ (+874), p=0.0335] and Afro-Americans [IL-10 (-819), p=0.0446, IL-6 (-174), $p<0.0001$, and IFN-γ (+874), $p<0.0001$]. Additionally, we observed that the distribution of haplotypes in IL-10 (-1082/-819/-592) in the population of Rio de Janeiro in comparison with that of Italy (p = 0.0293) and Afro-Americans (p =0,0025) is statistically different. Therefore, we conclude that the polymorphisms in IL-10, IL-6 and IFN-γ are distributed according to ethnicity in the population of Rio de Janeiro. The population of Rio de Janeiro have different frequencies of polymorphisms of the population of Bahia, Italy, Slovak and Afro-American, but similar to the population of São Paulo/Paraná. Our observations may be useful for future studies in association between genetic polymorphisms of cytokines and disease in the Rio de Janeiro population.

Keywords: Cytokines. Single nucleotide polymorphism. Ethnicity. Population.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização do gene de TNF-α no cromossomo 6..... 21

Figura 2 – Localização dos polimorfismos no gene do TGF-β1..... 23

Figura 3 – Localização do gene de TGF-β1 no cromossomo 19..... 24

Figura 4 – Localização do gene de IL-10 no cromossomo 1..... 25

Figura 5 – Localização dos polimorfismos no gene de IL-10..... 26

Figura 6 – Localização do gene de IL-6 no cromossomo 7..... 27

Figura 7 – Localização do gene de IFN-γ no cromossomo 12..... 28

Figura 8 – Esquema de análise da eletroforese, demonstrando possíveis resultados da PCR..... 38

Figura 9 – Foto do gel de agarose após corrida eletroforética de uma amostra submetida ao PCR..... 39

Figura 10 – Porcentagem da distribuição alélica e genotípica do polimorfismo em IL-10 (-819) entre Negros e Euro-Brasileiros..... 52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – SNPs e aminoácidos nas posições +869 e +915 do gene do TGF-β1..... 24

Quadro 2 – Programa de ciclagem para amplificação (One Lambda)..... 38

Quadro 3 – Relação entre o genótipo e os níveis de produção de citocinas..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos estudos envolvendo associação entre polimorfismos de citocinas e susceptibilidade/desenvolvimento de doenças nas populações brasileira..... 33

Tabela 2 – Resumo dos estudos em que não há associação entre polimorfismos de citocinas e susceptibilidade/desenvolvimento de doenças nas populações brasileiras..... 34

Tabela 3 – Número (n) e porcentagem (%) de voluntários de acordo com a cidade em que reside..... 37

Tabela 4 – Porcentagem da distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de citocinas (SNPs) entre homens e mulheres..... 42

Tabela 5 – Porcentagem da distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de citocinas em Brancos (B), Mulatos (M) e Negros (N) no Rio de Janeiro..... 44

Tabela 6 – Freqüência haplotípica de seqüências variantes nos genes de citocinas (TGF-β e IL-10) em Brancos, Mulatos e Negros da população do Rio de Janeiro..... 45

Tabela 7 – Seleção de 3 estudos realizados no Rio de Janeiro mostrando a distribuição dos polimorfismos de citocinas no grupo controle. Dados em porcentagem..... 46

Tabela 8 – Porcentagem da distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de citocinas nas populações do Rio de Janeiro (RJ), São Paulo/Paraná (SP/PR) e Bahia (Sa)..... 48

Tabela 9 – Porcentagem da distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de citocinas em Brancos (B), Mulatos (M) e Negros (N) comparados às populações de São Paulo/Paraná (SP/PR) e Bahia (Sa)..... 51

Tabela 10 – Porcentagem da distribuição alélica e genotípica do polimorfismo em IL-10 (-819) na amostra de população do Rio de Janeiro observada por Moraes et al..... 52

Tabela 11 – Porcentagem da distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos de citocinas nas populações do Rio de Janeiro, Itália , Eslováquia e em Afro-Americanos..... 53

Tabela 12 – Distribuição dos polimorfismos de acordo com os níveis de produção em Branco, Mulatos e Negros no Rio de Janeiro..... 56

Tabela 13 – Distribuição dos polimorfismos de acordo com os níveis de produção nas populações de Rio de Janeiro, Bahia, Itália e Afro-Americanos..... 57

Tabela 14 – Distribuição dos polimorfismos de acordo com haplótipos de TGF-β e IL-10 nas populações de Rio de Janeiro (RJ), Itália (It) e Afro-Americanos (AA)..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADIPOR - Receptor de Adiponectina
CONEP - Conselho Nacional de Pesquisa Envolvendo Seres-Humanos
CTL - Linfócito T Linfotóxico
CYP - Citocromo P450
FcγRI - Receptor para a porção Fc da IgG
GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos
G-CFS - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
HBV - Vírus da Hepatite B
HCV - Vírus da Hepatite C
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA - Antígeno Leucocitário Humano
HLA-UERJ - Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação (UERJ)
HTLV - Vírus T-linfotrópico humano
HUPE-UERJ - Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ)
IBGE - Instututo Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ - Interferon-gama
IFNG - Gene do IFN-γ
IL - Interleucina
IL6 - Gene da IL-6
IL10 - Gene da IL-10
kb - Kilo-bases
kDa - Kilo-Daltons
LPS - Lipopolisacarideo bacteriano
LT - Linfotoxina
NK - Células Natural Killers
NKT - Células Natural Killers T
mRNA - Acido Ribonucleico mensageiro
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
pg/ml - picograma/mililitro
PHA - Fitohemaglutinina

SNP	- Polimorfismo de um Único de Nucleotídeo
TGF-β	- Fator de Crescimento Transformante – beta
TGFB1	- Gene do TGF-β1
Th1	- Célula T helper tipo I
Th2	- Célula T helper tipo II
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	- Fator de Necrose Tumoral – alfa
TNFA	- Gene do TNF-α
TNFR	- Receptor para TNF
Tγδ	- Células T-gama/delta
UERJ	- Universidade do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	**A FORMAÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA**.....	15
2	**INFLUÊNCIA DA ANCESTRALIDADE**.....	16
3	**CITOCINAS**.....	18
3.1	**A citocina TNF-α**.....	20
3.2	**A citocina TGF-β**.....	21
3.3	**A citocina IL-10**.....	24
3.4	**A citocina IL-6**.....	26
3.5	**A citocina IFN-γ**.....	28
4	**A INFLUENCIA DAS CITOCINAS SOBRE DOENÇAS**.....	30
5	**JUSTIFICATIVA**.....	32
6	**OBJETIVOS**.....	35
7	**MATERIAL E METODOS**.....	36
7.1	**Extração do DNA e PCR**.....	37
7.2	**Análise estatística**.....	40
8	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....	41
8.1	**Polimorfismo de citocinas na população do Rio de Janeiro**.....	41
8.2	**Polimorfismo de citocinas na população brasileira**.....	46
8.3	**Polimorfismo de citocinas nas populações mundiais**.....	54
8.4	**Análise haplotípica e fenotípica**.....	55
8.5	**A influência do genótipo sobre a produção de citocinas**.....	57
9	**CONCLUSÕES**.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	APENDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	72
	APENDICE B – Questionário para os membros do estudo.....	74
	ANEXO A – Aprovação pelo comitê de ética.....	76
	ANEXO B – Ficha de interpretação.....	77

INTRODUÇÃO

Citocinas são um grupo diversificado de proteínas não humorais que agem como mediadoras entre células. Elas foram inicialmente identificadas como produtos das células imunes que agem como mediadoras e reguladores dos processos imunes mas agora se sabe que muitas citocinas são produzidas por células que não são do sistema imune e que têm efeito no sistema não-imune também. Citocinas estão sendo usadas clinicamente como modificadores de resposta biológica para o tratamento de várias doenças. As citocinas não são tipicamente armazenadas como proteínas pré-formadas. Ao invés disso a sua síntese é iniciada por transcrição gênica e seus RNAm têm vida curta.

A população brasileira possui uma característica única, resultado da miscigenação ocorrida entre brancos, negros, índios e diversas outras etnias que imigraram ao longo dos últimos cinco séculos.

Uma vez que o polimorfismo gênico determina a função e a quantidade de citocinas produzidas, estudar os polimorfismos presentes na população brasileira se torna uma importante ferramenta a fim de entendermos o mecanismos de muitas doenças.

1 A FORMAÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA

A população brasileira é uma das mais heterogêneas populações mundiais, sendo um resultado de cinco séculos de cruzamentos inter-étnicos entre indivíduos provenientes de três continentes: colonizadores europeus, representados principalmente pelos portugueses, escravos africanos sub-saharianos e índios sul-americanos. Os índios provavelmente colonizaram a América do Sul no pleistoceno (1). Quando os portugueses chegaram no ano de 1500, havia aproximadamente 2,5 milhões de índios vivendo na área que hoje compreende o Brasil. A colonização do Brasil, inicialmente, envolveu somente homens; a imigração de mulheres européias foi insignificante durante os primeiros séculos de colonização (2). Assim que os colonizadores chegaram, o cruzamento entre homens portugueses e mulheres indígenas teve início. A partir do século XVIII, esse cruzamento foi estimulado como estratégia ao crescimento populacional e ocupação da então colônia brasileira (3). Indivíduos do continente africano foram introduzidos no Brasil a partir do século XVI como escravos para trabalharem nas plantações de cana de açúcar e, posteriormente, nas minas de ouro e plantações de café. Em 1808 a corte portuguesa se mudou para o Brasil e deu início à abertura dos portos às nações amigas. Esse ato foi seguido por uma intensa chegada de exploradores provindos de outros países. Estima-se que durante o período de 1820-1975, 5,6 milhões de imigrantes aportaram oficialmente no Brasil (IBGE 2000 – www.ibge.gov.br). Eles eram principalmente portugueses e italianos (cerca de 70%), seguidos por espanhóis e alemães. Já no século 20, a imigração de asiáticos foi proeminente, principalmente por japoneses, mas também de libaneses e sírios. Aproximadamente 58% dos imigrantes que vieram ao Brasil entre 1500 e 1972 foram europeus; 40% de negros africanos e 2% de asiáticos (4).

2 **INFLUÊNCIA DA ANCESTRALIDADE**

Como conseqüência ao estímulo do crescimento da população brasileira, a maioria dos cromossomos Y em indivíduos brancos do sexo masculino na população brasileira possui genes que permitem a sua identificação como de origem européia, com baixa freqüência de cromossomos Y originados da África sub-sahariana e ausência de contribuição indígena (5). Por outro lado, ao se analisar o DNA mitocondrial, foi possível encontrar grande quantidade de contribuição de índios e negros do sexo feminino ao pool de DNA mitocondrial de brasileiras brancas (6). Esses dados indicam que a população brasileira foi formada, na sua essência, pelo cruzamento entre europeus do sexo masculino, índias e negras.

No entanto, devido ao fato do Brasil possuir dimensões continentais, e da imigração ao longo dos séculos ter se dado, muitas vezes, em regiões específicas, e de uma intensa migração interna, a população brasileira passou a ter uma característica extremamente heterogênea. Quando o DNA mitocondrial é analisado em indivíduos brasileiros distantes geograficamente, separados por quatro regiões do Brasil - Norte, Nordeste, Sudeste e Sul - foi observada uma predominância de linhagem matrilínea ameríndia na região amazônica, uma preponderância de linhagens africanas no Nordeste, um equilíbrio no Sudeste, e uma dominância européia na região Sul (7). Adicionalmente, os estudos com cromossomos Y realizados na população do Rio de Janeiro indicam que a maioria do pool genético presente em homens é de origem européia (8).

Parra *et al* (7) demonstraram que as características fenotípicas como cor da pele, formato do nariz, formato e cor dos cabelos e espessura dos lábios são instrumentos pobres para se determinar a ancestralidade de uma população. No entanto, este mesmo artigo ressalta a influência da ancestralidade em populações de diferentes regiões do Brasil. Assim, a contribuição africana na população urbana do Brasil varia de 4% a 34%, dependendo da região, e a indígena, de 0% a 27%. Na população do nordeste (urbana e rural), há 51% de ancestralidade européia, 36% africana e 13% indígena, enquanto que na região Norte, a influencia da ancestralidade é 47% européia, 12% africana e 41% indígena. No estado do Rio Grande do Sul há uma ancestralidade genética de 82% de europeus, 7% africanos e 11% de indígenas. Portanto, apesar da heterogeneidade da população brasileira, e

de ela ser considerada uma população mista, não há como se negar a influência genética da ancestralidade na nossa população (9).

As diferenças regionais na população brasileira nos instigam a pesquisar a carga genética presente em grupos que se encontram distantes geograficamente. Assim, supõe-se encontrar variações genéticas em brasileiros de diferentes partes do Brasil, refletindo as características migratórias e a pressão seletiva que cada grupo sofreu ao longo dos séculos. Essas diferenças genéticas são importantes, por exemplo, na resposta imunológica que cada indivíduo desenvolve em resposta a infecções, após o transplante de órgãos e no câncer (10, 11).

3 **CITOCINAS**

Citocinas são pequenas proteínas solúveis produzidas por vários tipos celulares em resposta a um determinado estímulo. Elas podem agir de maneira autócrina, afetando o comportamento das próprias células que as produziram; de uma maneira parácrina, afetando células adjacentes; ou ainda de maneira endócrina para aquelas citocinas que são estáveis o suficiente para afetar o comportamento de células distantes. Há duas famílias principais de citocinas: a família das hematopoetinas, a qual inclui os hormônios de crescimentos e também muitas interleucinas com funções na imunidade adaptativa e inata; e a família TNF, que também exerce funções em ambas as imunidades adaptativa e inata. As citocinas produzidas por macrófagos em resposta a patógenos incluem interleucina (IL)-1β, IL-6, IL-12, IL-8 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α). Os linfócitos T produzem uma grande variedade de citocinas: interferon-gama (IFN-γ), IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF-α, fator de crescimento transformante-beta (TGF-β), IL-17, entre outras (12).

A nomenclatura das citocinas é freqüentemente baseada em suas fontes celulares. As citocinas que são produzidas por fagócitos mononucleares eram chamadas monocinas, e aquelas produzidas por linfócitos eram chamadas linfocinas. Com o desenvolvimento de sondas moleculares, tornou-se claro que a mesma proteína pode ser sintetizada por linfócitos, monócitos e uma variedade de células de outros tecidos, incluindo células endoteliais e algumas células epiteliais. Desse modo, o termo genérico citocinas é o nome preferido para essa classe de mediadores. Como muitas citocinas são sintetizadas por leucócitos (ex. linfócitos T) e atuam em outros leucócitos, elas também são chamadas interleucinas. Esse termo é imperfeito porque muitas citocinas que são sintetizadas apenas por leucócitos não são chamadas interleucinas, por razões históricas, enquanto muitas citocinas chamadas interleucinas são fabricadas por ou agem sobre outras células que não os leucócitos. Entretanto, o termo é útil porque, à medida que novas citocinas são caracterizadas molecularmente, elas recebem um número de interleucina (p. ex., IL-1, IL-2, e assim sucessivamente) para manter uma nomenclatura padronizada (13, 14).

As citocinas e seus receptores são classificados em famílias distintas de proteínas estruturalmente relacionadas e iniciam sua ação por ligação a receptores específicos na membrana da célula-alvo, desencadeando uma via de transdução de sinais que levam a alterações da expressão gênica. A expressão de muitos receptores de citocinas é regulada por sinais específicos podendo ser outra citocina ou a mesma que se liga ao receptor. Podem ter ações pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas ou antagônicas e geralmente participam de um sistema de indução em cascata. Atuam como reguladores positivos ou negativos da resposta imunológica, inflamatória e reparadora do hospedeiro a lesões. Suas ações individuais na imunidade são complexas, uma vez que elas agem em um microambiente repleto de uma população heterogênea de células em diferentes estágios de ativação (15). Assim as citocinas podem ser geralmente caracterizadas como tendo efeitos estimulantes (pró-inflamatório) ou inibidores (anti-inflamatório) dependendo do subtipo de clone de linfócitos T helper ativados.

Citocinas derivadas de linfócitos T CD4+ possuem uma importante função nas infecções virais, promovendo a eliminação de patógenos intracelulares, bem como a geração de linfócitos T citotóxicos (CTL) e ativação de células *Natural Killers* (NK). Respostas caracterizadas pela produção de IL-2, TNF-α e IFN-γ são ditas Th1. As respostas tipo 2 são caracterizadas por IL-4, IL-5 e IL-10, as quais promovem resposta humoral e podem inibir respostas Th1 (12).

Como a produção de citocinas está sob controle genético, variações na região promotora dos genes das citocinas podem alterar significativamente seus níveis de produção, afetando, assim, o desenvolvimento da resposta imunológica. Dos muitos tipos de polimorfismos presentes no genoma humano, o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) é o tipo mais freqüente (16). Os SNPs podem influenciar a atividade do promotor ou a conformação do DNA ou pré-mRNA, e ainda pode influenciar a expressão fenotípica (17).

A distribuição dos SNPs pode variar bastante entre diferentes grupos étnicos, o que poderia contribuir na freqüência de determinadas patologias (18). Vários estudos sugerem que certos polimorfismos genéticos de citocinas estão associados a muitas doenças, incluindo doenças auto-imunes, infecciosas, alérgicas e cardiovasculares (19). Entretanto, a associação desses polimorfismos com uma determinada doença, em uma população, não pode ser extrapolada para outras populações com *background* genético diferente (20). Daí a importância de se

estudar tais polimorfismos em uma população específica, observando características exclusivas nesta população.

3.1 **A citocina TNF-α**

O TNF-α é sintetizado principalmente por macrófagos e monócitos. Neutrófilos, linfócitos T e células NK também podem produzir TNF-α. Sua produção é estimulada, sobretudo, por lipopolissacarídeos, vírus, bactérias intracelulares e células neoplásicas, mas também por IFN, IL-1, IL-2 e bradicinina. É inibida por ciclosporina, dexametasona e IL-6. Existem receptores para TNF-α (TNFR ou CD120) em células hematopoéticas, em muitas células nucleadas e em células mielóides. A principal atividade biológica do TNF-α é uma acentuada citólise em diferentes linhagens neoplásicas, tendo ação antitumoral muito significativa. É o principal mediador na caquexia das neoplasias malignas: ação na hematopoese, na ativação de neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, aumenta a migração transendotelial, tendo, assim, uma importante ação fisiológica na defesa contra microrganismos (21).

Altas concentrações de TNF-α no sangue de pacientes com septicemias por bactérias gram-negativas correlacionam-se com a piora do prognóstico. Portanto, acredita-se em uma importante ação deletéria de TNF-α quando sintetizado em quantidades excessivas, ao contrário da ação benéfica frente a situações que determinam sua síntese em quantidades moderadas. Variações na região promotora do gene que codifica TNF-α podem influenciar sua produção, determinando, assim, a susceptibilidade a doenças. Com base nesse argumento, SNPs na região promotora do gene TNF-α têm sido investigados por seus efeitos na transcrição gênica bem como por sua possível correlação com alguma doença em particular, como no diabetes (22) ou em doenças inflamatórias (23). Os SNPs mais estudados são os presentes nas posições -376, -308 e -238, todos com substituição do nucleotídeo Guanina (G) por Adenina (A) (24).

O gene do TNF-α está localizado no cromossomo 6, posição p21.3 (figura 1). O TNF-α é sintetizado inicialmente como um polipeptídeo de 26 kDa e 233

aminoácidos com uma pré-seqüência de 76 aminoácidos, que é clivada por metaloproteinases altamente específicas algumas horas depois de estar ancorado na membrana celular. Sem a pré-seqüência, seu peso molecular é 17 kDa e possui 157 resíduos de aminoácidos. Assim sendo, pode apresentar-se nas formas solúvel ou ligada à membrana (forma não processada com 233 aminoácidos e 26 kDa). Na forma biologicamente ativa é um homotrímero cuja massa molecular é 52 kDa, apresentando formato de cone triangular ou piramidal onde cada lado é formado por uma diferente subunidade monomérica. Os sítios de ligação aos receptores situam-se na metade inferior da estrutura piramidal, o que permite a ligação simultânea com mais de um receptor (25).

Figura 1. Localização do gene de TNF-α no cromossomo 6.

3.2 **A citocina TGF-β**

O TGF-β é uma citocina multifuncional que desenvolve importantes funções na modulação do crescimento, migração, proliferação e diferenciação celular, imunoregulação e reparo tecidual, no qual aumenta a síntese de colágeno e promove a angiogenese (26). Ele é reconhecido por sua variedade de ações imunossupressivas sobre as várias linhagens de leucócitos, e a deficiência desta citocina pode levar a uma patologia inflamatória grave e à morte. Também inibe a expressão de moléculas MHC classe II e aumenta a atividade do TNF-α, IFN-γ e Linfotoxina-β (LT) (27). Muitas células normais expressam TGF-β constitutivamente,

e produzem-no em maiores quantidades quando estimuladas. Estas incluem plaquetas, macrófagos, linfócitos T e B, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, astrócitos e células microgliais. Inibe a síntese mitogênica de IFN-γ, IL-2, IL-3, GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos) e TNF, suprime a hematopoese pela inibição da célula-tronco hematopoética e regula os receptores para IL-3 e G-CFS (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos) nas células hematopoéticas. No sítio inflamatório, induz a quimiotaxia de neutrófilos, monócitos, linfócitos, mastócitos e fibroblasto, ativando essas células a produzirem citocinas inflamatórias (IL-1, TNF, IL-6) e aumentando a adesão leucocitária à parede dos vasos e matriz extracelular (28). Recentemente, foi descrito que o TGF-β promove a transição epitélio-mesenquimal, um processo no qual as células epiteliais perdem sua conformação inicial e adquirem um comportamento migratório (29). Além disso, é sabido que o TGF-β está diretamente envolvido na formação de fibrose (30), induzindo, por exemplo, uma prolongada e progressiva fibrose pleural associada à diminuição da função pulmonar (31).

A produção do TGF-β1 está sob controle genético e a variação individual nos níveis de produção do mesmo é influenciada pela existência de variações genéticas. Foram identificados cinco tipos de variações polimórficas no gene TGFB1: duas na região do promotor, nas posições -800 (G/A) e -509 (C/T); uma na posição +72 (inserção de C), em uma região não traduzida; e duas na seqüência sinal no primeiro éxon, nas posições +869 (T/C) e +915 (G/C), os quais foram analisados neste estudo (Figura 2). A mutação na posição +869 determina uma mudança do aminoácido leucina para prolina no códon 10, enquanto a da posição +915 altera o códon 25, substituindo a arginina para prolina (Quadro 1). Uma pessoa será considerada alta produtora da proteína TGF-β1 se o códon 10 traduzir para o aminoácido leucina, e o códon 25 para a arginina. Ao contrário, para ser baixa produtora, deverá traduzir para prolina em ambos os códons (32).

O gene TGFB1 está localizado no cromossomo 19q13 e contem sete exons (33) (Figura 3). As moléculas protéicas de TGF-β são homo ou heterodímeros compostos de subunidades de 12,5 kDa, secretadas pela célula como complexos precursores latentes, que são clivados por proteases exógenas e dessa forma ativados. A forma biologicamente ativa é composta por 110 a 140 aminoácidos altamente conservados (34, 35).

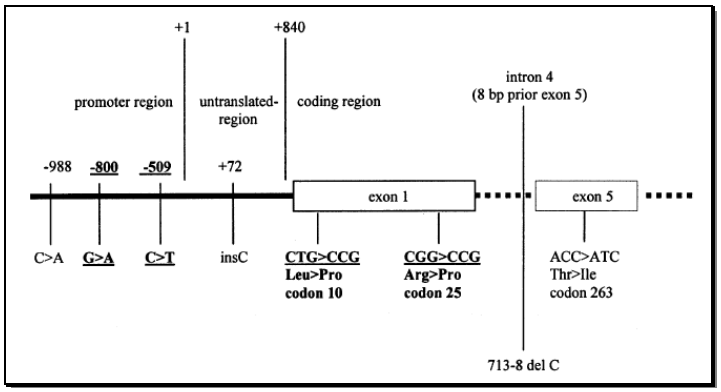

Figura 2. Localização dos polimorfismos no gene do TGF-β1. Adaptado de Gewaltig *et al* (36).

Em termos gerais, para uma população caucasóide, pode-se atribuir o estado de alto, intermediário e baixo produtor de TGF-β1, de acordo com os genótipos Awad *et al* (32) também estudaram a relação entre as variantes polimórficas de TGFB1 e a produção de TGF-β1 por leucócitos de sangue periférico de 34 indivíduos saudáveis. Indivíduos com o genótipo homozigoto no códon 25 tiveram uma média de produção de TGF-β1=10.037 ± 745 pg/ml (alta produção), enquanto que os de genótipo prolina/arginina tiveram um valor médio de 6.729 ± 883 pg/ml (32). De um modo geral a expressão do TGFB1 é regulada nos níveis transcricional e pós-transcricional, dependendo do tipo celular e da isoforma específica, em resposta a uma variedade de estímulos externos (28).

Quadro 1: SNPs e aminoácidos nas posições +869 e +915 do gene TGFB1
Adaptado de Awad *et al* (32).

TGF-β1		
Posição	+869	+915
Códon	10	25
SNP	T →C	G → C
Aminoácido	Leucina → Prolina	Arginina → Prolina

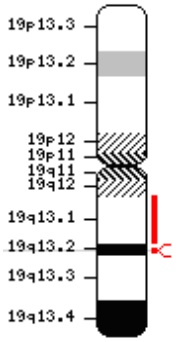

Figura 3: Localização do gene de TGF-β1 no cromossomo 19.

3.3 **A citocina IL-10**

A IL-10 foi originalmente descrita como um fator inibitório produzido por linfócitos Th2 de murinos que suprimem a produção de IFN-γ produzido por linfócitos Th1. Além de inibir o IFN-γ, ele tem a capacidade de inibir GM-CSF, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF, além de reduzir a proliferação de linfócitos T (37). IL-10 também pode alterar a função de células apresentadoras de antígenos, tais como células de Langerhans e macrófagos. Uma ampla variedade de tipos celulares pode produzir IL-10, incluindo linfócitos T, linfócitos B, células dendríticas e macrófagos (38).

O gene IL10 contém cinco éxons e localiza-se no cromossomo 1, entre 1q31 e 1q32 (Figura 4), ocupando aproximadamente 5,1kb (14). A ativação da expressão gênica da IL-10 resulta em um RNA mensageiro (mRNA) de 2kb. Em contraste a outras citocinas, sua transcrição pode ser regulada por fatores de transcrição Sp1 e Sp3, os quais são expressos constitutivamente por muitos tipos celulares.

Combinado com o controle da estabilidade do mRNA do IL10 ao nível pós-transcripcional, acredita-se que o gene IL10 é transcrito, até certo grau, constitutivamente e está sujeito a controle por alteração de mecanismos de degradação de RNA pós-transcripcionais. Essa situação, sob certas circunstâncias, facilitaria um controle mais eficiente da expressão da IL-10 (39).

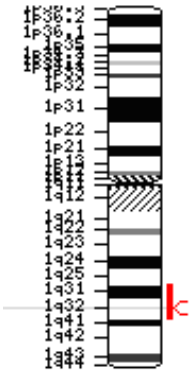

Figura 4: Localização do gene de IL-10 no cromossomo 1.

Muitos polimorfismos foram identificados na região promotora da IL-10, incluindo -1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A (Figura 5), os quais produzem três haplótipos em caucasianos (GCC, ACC e ATA). A presença da base nitrogenada A na posição -1082 foi correlacionada com baixa produção da IL-10 após estimulação de linfócitos T *in vitro* (40). Esta variante parece ter aplicabilidade clínica, visto que alguns alelos da região promotora podem determinar baixa, intermediária ou alta produção de IL-10.

A IL-10 inibe a síntese de citocinas, tais como IFN-γ, TNF-α, GM-SCF e LT. Ela inibe a produção de citocinas pelos linfócitos T CD4+ quando monócitos, mas não linfócitos B, são utilizados como células apresentadoras de antígenos. A IL-10 também inibe a síntese de citocinas dependentes de monócitos/macrófagos. A IL-10 inibe não somente citocinas, mas também a proliferação de linfócitos T. Ao contrário, a IL-10 estimula a expressão de receptor para a porção Fc da IgG (FcγRI) em monócitos humanos, fato este correlacionado com o aumento da capacidade de monócitos/macrófagos fagocitarem partículas opsonizadas e bactérias. A IL-10

estimula a resposta imunológica Th2, que inclui a produção de IL-4 e IL-5, as quais atuam na proliferação e diferenciação de linfócitos B (37).

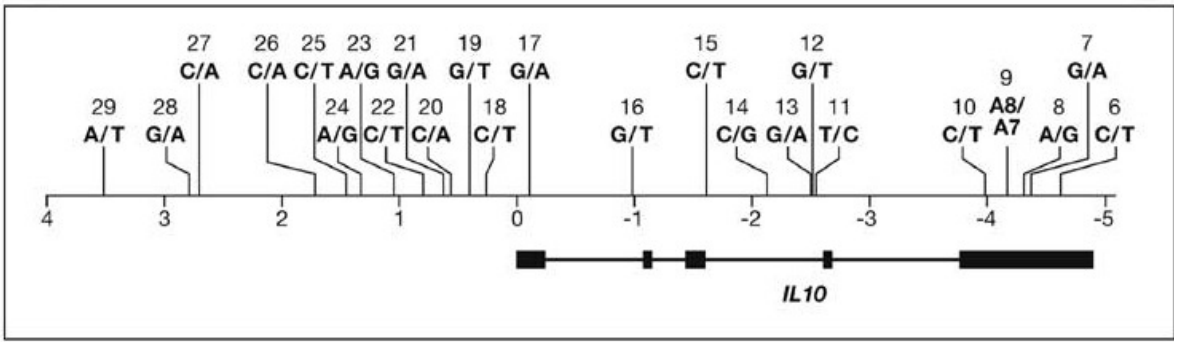

Figura 5: Localização dos polimorfismos no gene de IL-10. Os SNPs -1082, -819 e -592 estão representados pelos números 23, 22 e 20, respectivamente. (adaptado de Oleksyk *et al* (41).

3.4 **A citocina IL-6**

Desde a descoberta de que os linfócitos B interagiam com os linfócitos T para produzirem anticorpos, a caracterização de moléculas que medeiam a atividade de linfócitos T tem sido uma busca constante na imunologia. A partir da descoberta, na década de 70 do século passado, de que a IL-1 e IL-2 estavam envolvidas na regulação imunológica, novos fatores que regulavam o crescimento e a diferenciação de linfócitos B foram extensivamente estudados. Como conseqüência, em 1986, a IL-6 foi pela primeira vez clonada (42). Estudos posteriores revelaram que a IL-6 atua não somente sobre linfócitos B, mas também exibe uma ampla variedade de efeitos biológicos em outras células e tecidos: ela atua como um fator estimulante de hepatócitos, ativa várias proteínas de fase aguda no fígado; sua ação sobre células hematopoéticas promove a transição da fase G0 para G1 do ciclo celular em colaboração com a IL-3; e induz a maturação de megacariócitos, resultando no aumento de plaquetas (43).

A IL-6 é produzida localmente ou liberada na circulação em situações de desequilíbrio homeostático, como endotoxemia, pulmão endotóxico, trauma e

infecções agudas. Pode estar envolvida em doenças inflamatórias relacionadas ao sistema imunológico, como artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil sistêmica e doença de Crohn (44). Em adição a sua participação na imunidade contra infecções intracelulares, a IL-6 circulante, juntamente com TNF-α e IL-1, é conhecida por induzir respostas agudas caracterizadas por febre e liberação de corticosterona. Igualmente, a IL-6 endógena desenvolve uma função crucial nas respostas inflamatórias agudas e sistêmicas, controlando os níveis de citocinas proinflamatórias (45).

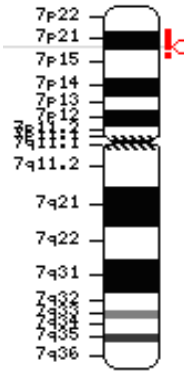

Figura 6: Localização do gene de IL-6 no cromossomo 7.

O gene IL6 localiza-se no cromossomo humano 7 em 7p21 (Figura 6) e consiste de 5 éxons e 4 íntrons. Transcreve para mRNA de 1,3kb e traduz para uma proteína de 26-kDa (46). O gene IL6 não contém nenhum polimorfismo em sua região codificante, portanto os estudos nessa área são todos voltados para sua região promotora. O polimorfismo na posição –174 G/C, descrito por Fishman *et al.* (47), é o mais amplamente estudado em relação a IL-6. Neste estudo, a transfecção gênica em cultura de células demonstrou que o alelo –174G expressa níveis até 60% mais altos de transcritos do que o alelo –174C. Além disso, os níveis de IL-6 circulantes foram 68% mais altos em indivíduos portadores do genótipo GG em oposição ao CC (47). Consistentemente a essas observações, Belluco *et al.* (48) reportaram que os níveis séricos de IL-6 são mais altos em pacientes com câncer coloretal portadores do genótipo GG do que os genótipos GC e CC.

3.5 **A citocina IFN-γ**

O IFN-γ foi descoberto na década de 60. Quando leucócitos humanos em cultura eram estimulados por fitohemaglutinina (PHA), havia produção de um inibidor viral, com propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes ao interferon, exceto por uma instabilidade sob condições ácidas. Este composto foi denominado IFN-γ (49). O IFN-γ é produzido tanto por células do sistema imunológico inato (células NK, linfócitos Tγδ) quanto por células do sistema imunológico adaptativo (linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+ Th1). As células NK são a primeira fonte de IFN-γ durante uma infecção. Células NKT atuam como uma ponte entre as respostas imunológica inata e adaptativa, secretando IFN-γ ao serem estimuladas (50, 51). O IFN-γ desenvolve uma importante função no controle de infecções intracelulares e desenvolvimento de tumores, e geralmente está associado com o TNF-α.

Em adição à sua atividade antiviral, o IFN-γ exerce amplas funções biológicas: aumenta a apresentação de antígenos por MHC de classe I e II; influencia o ciclo celular, crescimento e apoptose; promove a interação leucócito-célula endotelial; e funções imune-regulatórias, como a inibição do desenvolvimento de linfócitos T CD4+ Th2 (51-53).

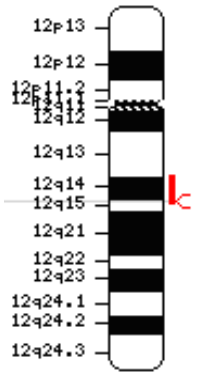

Figura 7: Localização do gene de IFN-γ no cromossomo 12.

O gene IFNG está localizado no cromossomo 12, em 12q14.1 (Figura 7); contém 4 éxons com dimensão de 5,4kb (13). Quando expresso, o gene produz um homodímero não-covalente, que consiste de dois polipeptídios de 166 resíduos. A forma biologicamente ativa do IFN-γ é um homodímero de 34kD. Como no gene da

maioria da citocinas, não há mutações localizadas em sua região codificante. Muitos polimorfismos têm recebido atenção especial dos pesquisadores, incluindo uma variação no íntron 1 +874 T/A (54).

4 A INFLUÊNCIA DAS CITOCINAS SOBRE DOENÇAS

Neste trabalho, nós estudamos os principais polimorfismos envolvidos com a susceptibilidade e/ou proteção de muitas doenças, bem como em transplantes:

O TNF-α possui um amplo espectro de atividades biológicas. Ele possui participação importante em processos patológicos como trombose venosa, arteriosclerose e vasculite. Portanto, embora o TNF-α seja requerido para a resposta imunológica, sua produção excessiva pode ter sérias conseqüências patológicas. O polimorfismo em sua região promotora –308 tem sido associado com câncer hepático (55), câncer gástrico (56), e colite ulcerativa em Asiáticos, mas não em Europeus(57). Além disso, o polimorfismo em TNF-α está relacionado ao desenvolvimento de Dermatomiosite juvenil (58) e Hepatite B (59).

O TGF-β é conhecido como um potente inibidor de células epiteliais transformadas, de células endoteliais, fibroblastos, células linfóides e outros tipos de células hematopoéticas. Ele também estimula a síntese e inibe a degradação das principais proteínas de matriz extracelular, incluindo colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibronectina, integrinas e osteopontina. Devido ao seu amplo envolvimento nas patologias, o papel dos polimorfismos em TGF-β nas doenças ainda é controverso. Ele facilita o desenvolvimento de cirrose (60), mas aumenta a taxa de respondedores à terapia em pacientes co-infectados por HCV/HIV (61). Ele também está relacionado ao sucesso do transplante hepático, mas alta produção dessa citocina podem estar relacionado à rejeição aguda do enxerto (62).

A IL-10 tem como principal função a regulação de linfócitos T e linfócitos B. Muitos autores têm relacionado os polimorfismos na região promotora da IL-10 a muitas doenças, incluindo: cânceres (63-65), doenças virais (66, 67), malaria (68), entre outras (69, 70).

A IL-6 atua como um fator de diferenciação de linfócitos B e um fator de ativação para linfócitos T. Dos polimorfismos estudados, a variação na posição –174 da IL-6 é o que traz mais resultados ambíguos. IL-6 (-174) pode estar relacionado ao câncer de próstata (71), doença enxerto versus Hospedeiro (GVHD) após transplantes de células hematopoéticas (72), mas possui resultados controversos em pacientes infectados por HCV (73, 74). Da mesma forma, o polimorfismo em IL-6

parece estar relacionado com Diabetes *mellitus* em populações caucasóides, mas não em Taiwaneses (75).

O IFN-γ influencia os mecanismos mediados por células da citotoxicidade e é um modulador do crescimento e diferenciação dos linfócitos T. Grandes quantidades de IFN-γ são produzidas sob certas circunstâncias patológicas, tais como infecções, traumas, câncer e autoimunidade. Ele tem sido relatado como estando envolvido no diabetes tipo I, artrite reumatóide e esclerose múltipla (76).

5 **JUSTIFICATIVA**

Citocinas são pequenas proteínas ou glicoproteínas produzidas por uma ampla variedade de tipos celulares e exercem muitas funções nas reações imunológicas e inflamatórias. É sabido que polimorfismos nas regiões promotoras das citocinas influenciam a quantidade de proteínas formadas. Um grande número de estudos tem concedido evidencias de que estes polimorfismos influenciam na susceptibilidade a doenças, resposta a terapias com drogas, e no sucesso de transplantes (77-79).

O detalhamento do perfil genético de certas populações é válido e amplamente pesquisado em todo o mundo (80). No Brasil, os estudos envolvendo polimorfismos de citocinas são numerosos, porém, na sua maioria são em associação com doenças e limitado a poucas citocinas. A Tabela 1 apresenta uma lista dos trabalhos desenvolvidos no Brasil que encontraram uma associação positiva entre polimorfismo de citocinas e a doença estudada. Ainda assim, há trabalhos que não encontraram diferenças significativas entre a distribuição de polimorfismos nos grupos controle e pacientes na população brasileira (Tabela 2). Isto demonstra que a influência de polimorfismos no Brasil pode ser específica para a doença e para a população estudada.

Através dos estudos genéticos, podem-se traçar as rotas migratórias e evolutivas de uma determinada população. A associação entre diversos polimorfismos existentes no genoma humano e doenças, tanto doenças autoimunes quanto infecciosas, é uma ferramenta importante para o melhor entendimento das doenças as quais o homem está sujeito, muitas das quais ainda sem uma cura definitiva. Devido a diferenças marcantes na distribuição dos polimorfismos de citocinas entre várias etnias, é importante que estudos de freqüências de tais polimorfismos sejam realizados em uma determinada população (81).

Tabela 1. Lista dos estudos de polimorfismos de citocinas (TNF-α (-308), TGF-β (códons 10 e/ou 25), IL-10 (-1082 e/ou –819 e/ou –592); IL-6 (-174) e IFN-γ (+874)) associados com susceptibilidade/desenvolvimento de doenças em populações brasileiras. (Ref. = Referência).

Citocina	Doença	Estado	N Doença	N Controle	Ref.
TNF-α (-308)	Desordem obsessiva compulsiva	São Paulo	111	250	(82)
	Doença enxerto versus hospedeiro crônica	São Paulo	122	-	(83)
	Febre reumática	São Paulo	318	281	(84)
	Líquen plano oral	Minas Gerais	53	53	(85)
	Estomatite aftosa	Minas Gerais	64	64	(86)
	Paracoccidioidomicose	Minas Gerais	54	31	(87)
	Hanseníase	Rio de Janeiro	631	-	(88)
	Hanseníase	Rio de Janeiro	300	92	(89)
	Infarto do miocárdio	São Paulo	148	148	(90)
TGF-β (códons 10 e/ou 25)	Hepatite C crônica	Bahia	128	94	(91)
	Pancreatite crônica	Bahia	57	74	(92)
	Periodontite crônica	São Paulo	87	37	(93)
IL-10 (-1082 e/ou –819 e/ou –592)	Periodontite crônica	São Paulo	116	173	(94)
	Retinocoroidite toxoplasmica	Minas Gerais	100	100	(95)
	Linfoma de Hodgkin	São Paulo	65	50	(96)
	Paracoccidioidomicose	Minas Gerais	54	31	(87)
	Pré-eclampsia	São Paulo	151	189	(97)
	Hanseníase	Rio de Janeiro	297	283	(98)
	Epidermodisplasia verrucifore	São Paulo	22	27	(99)
	Hanseníase	Rio de Janeiro	300	92	(89)
IL-6 (-174)	Mielopatia associada ao HTLV-1	Salvador	133	100	(100)
	Doença cardiovascular	Brasília	193	224	(101)
	Liquen plano oral	Minas Gerais	53	53	(85)
	Abcesso dental sintomatico	Minas Gerais	45	53	(102)
	Doença periodontal severa	Minas Gerais	120	260	(103)
	Leishmaniose	Bahia	Não acessível		(104)
	Câncer cervical	São Paulo	56	253	(105)
	Doença enxerto versus hospedeiro	São Paulo	180	-	(106)
	Aborto espontâneo recorrente	Paraná	57	74	(107)
	Pênfigo foliáceo endêmico	Paraná	168	184	(108)
	Periodontite crônica	São Paulo	48	36	(109)
IFN-γ (+874)	Câncer cervical	São Paulo	83	85	(110)
	Tuberculose	Rio de Janeiro	93	266	(111)

Tabela 2. Lista dos estudos de polimorfismos de citocinas (TNF-α (-308), IL-10 (-1082 e/ou –819 e/ou –592); IL-6 (-174) e IFN-γ (+874)) em que não foi evidenciada associação com susceptibilidade/desenvolvimento de doenças em populações brasileiras. (Ref. = Referência).

Citocina	**Doença**	**Estado**	**N Doença**	**N Controle**	**Ref.**
TNF-α (-308)	Hepatite autoimune	Bahia	143	-	(112)
	Periodontite	Rio de Janeiro	160	-	(113)
	Periodontite agressiva generalizada	São Paulo	100	-	(114)
	Glossite migratória benigna	Minas Gerais	53	53	(115)
IL-6	Glossite migratória benigna	Minas Gerais	53	53	(115)
	Mielose múltipla	São Paulo	52	60	(116)
	Infecção por H. pylori	São Paulo	120	-	(117)
	Falha no implante dental	São Paulo	64	40	(118)
TGF-β	Falha no implante ósseo-integrado	São Paulo	68	-	(119)
IFN-γ	Leishimaniose	Rio de Janeiro	136	609	(120)

6 **OBJETIVOS**

- Determinar os genótipos e estimar as freqüências alélicas, genotípicas e fenotípicas de variantes polimórficas em genes de citocinas para as posições: –174 (G/C) do gene IL6; +869 (T/C) e +915 (G/C) do gene TGFB1; -1082 (A/G), -819 (C/T) e –592 (C/A) do gene IL10; -308 (G/A) do gene TNFA e +874 (T/A) do gene IFNG nas amostras de doadores saudáveis.
- Determinar as influências étnicas e de gênero sobre a distribuição dos polimorfismos estudados.
- Comparar a distribuição dos polimorfismos genéticos de citocinas na população de diferentes regiões do Brasil.
- Comparar os polimorfismos observados na população fluminense com outras populações mundiais (Itália, Eslováquia e Estados Unidos da América).

7 MATERIAL E MÉTODOS

Ao todo, 181 indivíduos participaram do estudo. Cento e sessenta e oito doadores voluntários do Banco de Sangue Herbert de Souza da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e treze estudantes ou profissionais do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação (HLA-UERJ) foram incluídos no estudo entre Junho e Novembro de 2008. Todos os doadores foram considerados em bom estado de saúde e apresentaram sorologia negativa para HCV, HBV, HIV, HTLV, Sífilis e Doença de Chagas. O projeto de pesquisa foi cadastrado no Conselho Nacional de Pesquisa Envolvendo Seres-Humanos (CONEP) e posteriormente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ) (Anexo A). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B)

O grupo consistiu de brasileiros nativos auto-declarados brancos (41,6%), mulatos (36,1%) e negros (22,8%). Os voluntários responderam a um questionário com informações sobre endereço de residência, naturalidade, escolaridade e etnia, incluindo etnia dos pais e avós maternos e paternos (Apêndice B). A idade dos voluntários variou entre 18 e 65 anos (média =36,3anos), sendo 47,5% homens (n=86) e 52,5% mulheres (n=95). A grande maioria dos voluntários (97,8%) é residente na região metropolitana do Rio de Janeiro, abrangendo uma área de aproximadamente 50Km^2 (Tabela 3).

Tabela 3: Número (n) e porcentagem (%) de voluntários de acordo com a cidade em que reside.

Cidade	N	%
Rio de Janeiro	150	83,3
Duque de Caxias	5	2,8
Nova Iguaçu	4	2,2
São Gonçalo	4	2,2
São João de Meriti	4	2,2
Belford Roxo	3	1,7
Niteroi	3	1,7
Mesquita	1	0,6
Nilópolis	1	0,6
Queimados	1	0,6
Magé	2	1,1
São Pedro da Aldeia	2	1,1

7.1 **Extração do DNA e PCR**

Dez mililitros de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis *Vacutainer®* com EDTA. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos, da qual foi extraído o DNA com auxílio do Kit "GFX Genomic Blood DNA Purification Kit" (Amersham Bioscience, UK), de acordo com as instruções do fabricante. Após a digestão das membranas celulares pela proteinase K, o material nucléico foi transferido para uma lã de sílica onde sofreu várias lavagens com solução alcoólica. A eluição se deu pela adição de água ultra-pura a 70ºC.

O DNA purificado foi submetido ao processo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O kit comercial *Cytokine Genotyping Tray* (One Lambda Inc. Canoga Park, CA, EUA) foi utilizado para amplificação dos genes de TNF-α, TGF-β, IL-10, IL-6, IFN-γ e β-Globina Humana (controle interno). Resumidamente, após a adição das quantidades apropriadas de *primeres*, sais, tampão e Taq polimerase, as amostras foram submetidas ao PCR com auxílio do termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de amplificação estão demonstradas no Quadro 2. O produto da amplificação foi analisado por eletroforese

horizontal em gel de agarose e visualizado com marcação por brometo de etídeo exposto à luz ultravioleta.

Quadro 2: Programa de ciclagem para amplificação (One Lambda)

Nº de ciclos	Passo	Temp (°C)	Tempo (seg)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Fim	1	4	∞

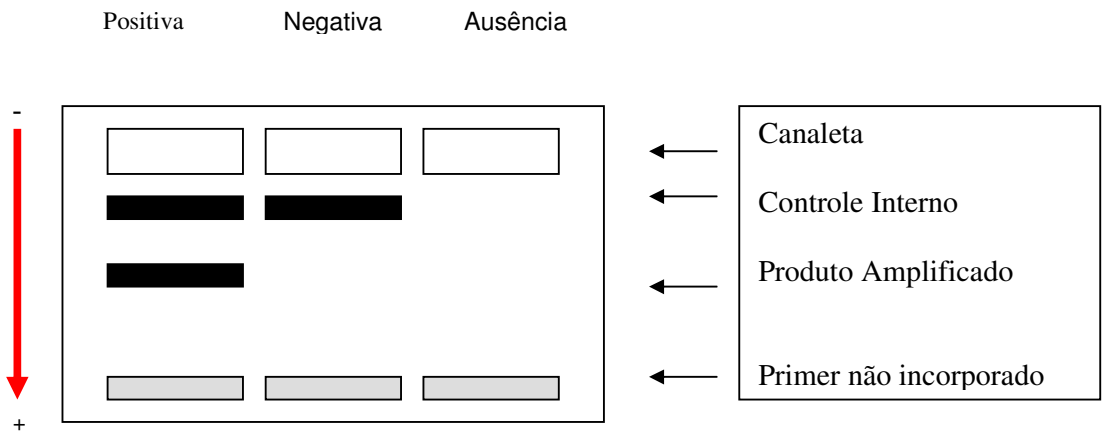

Figura 8: Esquema de análise da eletroforese, demonstrando possíveis resultados da PCR

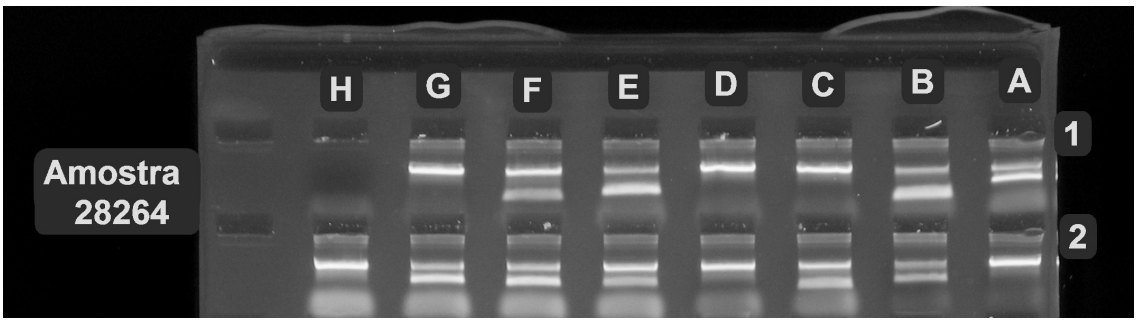

Figura 9: Foto do gel de agarose após corrida eletroforética de uma amostra submetida ao PCR. A interpretação é realizada com base na presença de fragmentos amplificados com auxílio da Ficha de Interpretação (Worksheet – Anexo B).

A interpretação dos resultados do PCR foi baseada na presença ou ausência de um fragmento específico amplificado (Figuras 8 e 9), de acordo com a Ficha de Interpretação que acompanha o Kit (Anexo B). De maneira resumida, deve-se verificar a presença da banda do controle interno amplificado, a qual deve estar presente em todas as canaletas onde foi adicionado o mix de amplificação. A ausência do controle interno invalida a amplificação na posição observada. A excessão é no controle negativo (canaleta 1H), que não deve ter nenhuma banda. Após a validação, dada pela presença da banda do controle interna, deve-se observar a presença ou ausência da banda do produto amplificado. Ao se observar esta banda, deve-se anotar na ficha de interpretação a presença desta banda. No exemplo dado, a presença da banda do produto amplificado se dá pelo código “8”, a ausência do produto amplificado pelo código “1”, e o controle negativo, “0”.

Assim, segundo a ficha de interpretação, as canaletas 1F e 1G contém os primeres para TNFA. De acordo com o exemplo dado, quando somente a canaleta 1F está amplificada, temos como resultado TNFA(-308)G/G, e assim por diante.

Ao todo, oito polimorfismos foram analisados nas cinco citocinas estudadas. Especificamente, para o TNF-α, a presença do alelo A ou G na posição –308 da região promotora gera três genótipos em potencial, correspondendo a dois fenótipos. Os genótipos A/A e G/A estão associados à produção de altos níveis transcripcionais de TNF-α, enquanto o genótipo G/G está associado com baixos níveis (121). No polimorfismo na região promotora da IL-6 ambos os genótipos G/G e G/C estão

relacionados à habilidade de produzir altos níveis de IL-6, uma vez que C/C está associado com baixos níveis desta citocina (47). O SNP mais estudado no gene do IFN-γ está localizado no primeiro Íntron do final 5', adjacente a uma região de repetição CA, no qual o alelo T está associado a alta produção de IFN-γ. Conseqüentemente, o genótipo T/T produz altos níveis de IFN-γ, o genótipo heterozigoto T/A produz níveis intermediários e o genótipo A/A, baixos níveis (122). Para o TGF-β, há nove possíveis combinações dos seus SNPs, os quais resultam em três fenótipos: alto, intermediário e baixo (123). Três diferentes polimorfismos foram analisados na região promotora da IL-10: posição –1082 (A/G), posição –819 (C/T), e posição –592 (C/A). Potencialmente, esses genótipos possibilitam a produção de diferentes níveis de IL-10 (40).

7.2 **Análise estatística**

As freqüências alélica e genotípica foram calculadas por contagem direta e então divididas pelo número de amostras ou pelos cromossomos para produzirem as freqüências relativas. O equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como o desequilíbrio de ligação pata TGF-β e IL-10 foram testados utilizando-se o software Arlequin versão 3.1 (Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 2005, 1:47-50).

Teste qui-quadrado com correção de Yates foi utilizado para comparar as freqüências alélicas e genotípicas entre os grupos étnicos com auxílio do programa Epi-Info (www.cdc.gov/epiinfo). Para a comparação entre a população observada no nosso estudos e as demais populações do Brasil, Europa e Estados Unidos da América, utilizou-se o programa Instat versão 3.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA – www.graphpad.com). O valor de P foi considerado significante quando menor que 0,05.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, nós genotipamos indivíduos saudáveis não consangüíneos, moradores do estado do Rio de Janeiro para polimorfismos nas citocinas TNF-α, TGF-β, IL-10, IL-6 e IFN-γ.

8.1 Polimorfismos de citocinas na população do Rio de Janeiro

Somente foi observada diferença na freqüência alélica entre os sexos em IL-10 (-1082 A/G), onde as mulheres apresentam uma maior freqüência do alelo G do que os homens (p=0,04 Tabela 4).

Franceschi *et al* propuseram que freqüências alélicas de citocinas são dependentes do sexo e desenvolve uma importante função no envelhecimento, proporcionando que homens e mulheres sigam caminhos diferentes para alcançar uma maior longevidade (124). Em italianos centenários do sexo masculino, Lio *et al* observaram um aumento na freqüência genotípica de IL-10 (-1082)GG (125). Em se tratando de doenças, Paladino *et al* demonstraram uma associação entre susceptibilidade a desenvolver infecção crônica por HCV e mulheres portadoras do genótipo GG em IL-10 (-1082) (126). Na nossa amostra, a freqüência do alelo G foi maior em mulheres do que em homens, mas não foram observadas diferenças quanto ao genótipo. No Brasil, Santos *et al* (89) observaram diferenças na distribuição alélica entre homens e mulheres de TNF-α (-308) em pacientes com Hanseníase. Mais estudos serão necessários para se definir a influência do sexo sobre a distribuição deste polimorfismo em populações.

Tabela 4: Porcentagem da distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de citocinas (SNPs) entre homens e mulheres.

SNPs	Alelo/ genótipo	Homens (%) (n=86)	Mulheres (%) (n=95)	P
TNFα (-308)	G	92,4	85,8	
	A	7,6	14,2	
	G/G	84,9	74,7	
	G/A	15,1	22,1	
	A/A	0	3,2	
TGFβ1 (Códon 10)	T	52,3	40,5	
	C	47,7	59,5	
	T/T	25,6	33,7	
	T/C	53,5	51,6	
	C/C	20,9	14,7	
TGFβ1 (Códon 25)	G	89,0	94,7	
	C	11,0	5,3	
	G/G	79,1	90,5	
	G/C	19,8	8,4	
	C/C	1,2	1,1	
IL-10 (-1082)	A	73,3	62,6	P=0,04
	G	26,7	37,4	
	A/A	55,8	43,2	
	G/A	34,9	38,9	
	G/G	9,3	17,9	
IL-10 (-819)	C	64,5	67,4	
	T	35,5	32,6	
	C/C	45,3	45,3	
	C/T	38,4	44,2	
	T/T	16,3	10,5	
IL-10 (-592)	C	64,5	67,4	
	A	35,5	32,6	
	C/C	45,3	45,3	
	C/A	38,4	44,2	
	A/A	16,3	10,5	
IL-6 (-174)	G	73,8	76,8	
	C	26,2	23,2	
	G/G	55,8	58,9	
	G/C	36,1	35,8	
	C/C	8,1	5,3	
IFNγ (+874)	T	39,5	36,8	
	A	60,5	63,2	
	T/T	15,1	18,9	
	T/A	48,8	35,8	
	A/A	36,0	45,3	

As freqüências alélicas e genotípicas observadas no nosso estudo em relação ao grupo étnico estão sumarizadas na Tabela 5.

A análise por etnias demonstrou uma menor distribuição alélica para IL-6 (-174)C entre os negros quando comparados com brancos ($p<0,0001$) e mulatos

(p=0,002). Para o gene do IFN-γ, a distribuição dos alelos T/A nos negros também foi significativamente diferente quando comparada aos brancos (p=0,005) e mulatos (p=0,028). IL-10 (-592C/A e –819C/T) é desigualmente distribuído entre negros e mulatos (p=0,004).

Similarmente, a distribuição dos genótipos de IL-6 (-174) GG/GC/CC foi diferente em negros quando comparados aos brancos (p<0,0001) e mulatos (p=0,009). O genótipo IFN-γ (+874) TT foi significativamente menos freqüente em negros do que em brancos (p=0,017), enquanto que o genótipo IL-10 -592CC e –819CC foi mais freqüente em mulatos do que em negros (p=0,009).

As freqüências haplotípicas de IL-10 (-1082/-819/-592) e TGF-β (Códon10/códon25) em Brancos, Mulatos e Negros encontram-se na Tabela 6. Existe desequilíbrio de ligação entre os pares de SNP em todos os grupos étnicos tanto em IL-10 quanto em TGF-β. Somente o IL10(-1082) em brancos não se encontrava em equilíbrio pelo teste de Hardy-Weinberg (p=0,0185).

A população brasileira forma uma das populações mais heterogêneas do mundo. Ameríndios, Brancos europeus e Negros africanos se uniram ao longo dos séculos para criar uma diversidade étnica e cultural sem igual. No presente estudo, nós utilizamos a autodeterminação do grupo étnico em brancos, mulatos e negros. Surpreendentemente, observamos diferenças nas distribuições alélica e genotípica em IL-6 (-174) e IFN-γ (+874) entre brancos e negros, bem como entre mulatos e negros para IL-6 (-174), IFN-γ (+874) e IL-10 (-592/-819). De acordo com Parra *et al* (7), a cor da pele é uma característica deficiente para se estimar a ancestralidade de um indivíduo. No entanto, alguns estudos têm proposto uma influência da origem étnica sobre o *background* genético, sendo possível determinar a ancestralidade da população através de estudos com marcadores de DNA mitocondriais em negros brasileiros (127). Da mesma forma, estudos com cromossomos Y reafirmam esta heterogeneidade, uma vez que a freqüência de haplótipos presentes no cromossomo Y é diferente entre as populações de diferentes regiões do Brasil (128).

Tabela 5: Porcentagem da distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de citocinas em Brancos (B), Mulatos (M) e Negros (N) no Rio de Janeiro.

SNP	Alelo/ Genótipo	Brancos (%) (n=75)	Mulatos (%) (n=65)	Negros (%) (n=41)	P
TNFα (-308)	G	90,0	89,2	86,6	
	A	10,0	10,8	13,4	
	G/G	81,3	81,5	73,2	
	G/A	17,3	15,4	26,8	
	A/A	1,3	3,1	0	
TGFβ1 (Códon 10)	T	52,0	58,5	59,8	
	C	48,0	51,5	40,2	
	T/T	28,0	32,3	29,3	
	T/C	48,0	52,3	61,0	
	C/C	24,0	15,4	9,8	
TGFβ1 (Códon 25)	G	89,3	95,4	91,5	
	C	10,7	4,6	8,5	
	G/G	80,0	90,8	85,4	
	G/C	18,7	9,2	12,2	
	C/C	1,3	0	2,4	
IL-10 (-1082)	A	66,7	63,1	76,8	
	G	33,3	36,9	23,2	
	A/A	50,7	40,0	61,0	
	G/A	32,0	46,2	31,7	
	G/G	17,3	13,8	7,3	
IL-10 (-819)	C	66,0	73,8	53,7	M x N: p=0,004
	T	34,0	26,2	46,3	
	C/C	45,3	56,9	26,8	
	C/T	41,3	33,8	53,7	M x N: p=0,009
	T/T	13,3	9,2	19,5	
IL-10 (-592)	C	66,0	73,8	53,7	M x N: p=0,004
	A	34,0	26,2	46,3	
	C/C	45,3	56,9	26,8	
	C/A	41,3	33,8	53,7	M x N: p=0,009
	A/A	13,3	9,2	19,5	
IL-6 (-174)	G	66,0	75,4	92,7	B x N: p<0,001 M x N: p=0,002
	C	34,0	24,6	7,3	
	G/G	41,3	58,5	85,4	
	G/C	49,3	33,8	14,6	B x N: p<0,0001 M x N: p=0,009
	C/C	9,3	7,7	0	
IFN-γ (+874)	T	44,0	40,0	24,4	B x N: p=0,005 M x N: p=0,028
	A	56,0	60,0	75,6	
	T/T	24,0	16,9	4,9	
	T/A	40,0	46,2	39,0	B x N: p=0,017
	A/A	36,0	36,9	56,1	

Tabela 6: Freqüência haplotípica de seqüências variantes nos genes de citocinas (TGF-β e IL-10) em Brancos, Mulatos e Negros da população do Rio de Janeiro.

SNPs	Freqüências dos Haplótipos			
TGF-β (códon10/códon25)	C-C	C-G	T-C	T-G
Branco (n=75)	0,11	0,37	0	0,52
Mulato (n=65)	0,05	0,37	0	0,58
Negro (n=45)	0,08	0,32	0	0,60
IL-10 (-1082/-819/-592)	A-T-A	A-C-C	G-C-C	
Branco (n=75)	0,34	0,33	0,33	
Mulato (n=65)	0,26	0,37	0,37	
Negro (n=45)	0,46	0,31	0,23	

Ao comparar três populações de diferentes regiões brasileiras - São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Bahia - Visentainer *et al* (129) observaram diferenças nas freqüências alélica e genotípica em IL-6 (-174). No mesmo estudo, Visentainer *et al* relataram que a freqüência do alelo A em IL-10 (-1082) foi menos freqüente na população de São Paulo/Paraná do que em uma população Afro-Brasileira do Rio de Janeiro. Ao observarmos diferenças significativas na distribuição de polimorfismos entre brancos, mulatos e negros, nós corroboramos a idéia de que alguns polimorfismos são distribuídos de acordo com a ancestralidade no Brasil.

De fato, trabalhos realizados na população brasileira indicam que a etnia influencia na freqüência de alguns polimorfismos genéticos, tais como nos genes do citocromo p450 (CYP) (130), N-acetiltransferase (131) e receptor de adponectina (ADIPOR) (132). No entanto, estudos de associação entre polimorfismos de citocinas e doenças que enfatizem a influência da etnia ainda são bastante escassos no Brasil. Ainda, a maioria destes estudos foi realizada na população do estado de São Paulo, havendo poucos estudos realizados na população do Rio de Janeiro. Destes, os principais estudos são com Hanseníase e Tuberculose (Tabela 1).

Os estudos utilizando os mesmos polimorfismos que nós são escassos na população do Rio de Janeiro, limitando-se a cerca de 8 trabalhos, segundo o levantamento bibliográfico no PUBMED (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) em janeiro de 2009. Em três destes estudos a distribuição dos polimorfismos em TNF-α, IL-10 e IFN-γ é similar à encontrada por nós (Tabela 7). No entanto, a maioria destes

estudos não segregou a população de acordo com a origem étnica. Portanto, nossos dados certamente serão úteis para comparação em futuros estudos caso-controle na população do Rio de Janeiro.

Tabela 7: Seleção de 3 estudos realizados no Rio de Janeiro mostrando a distribuição dos polimorfismos de citocinas no grupo controle. Dados em porcentagem.

Citocina	Alelo/ Genótipo	Nosso estudo n=181	Matos *et al* (120) n=609	Amim *et al* (111) n=266	Santos *et al* (89) n=92
TNF-a (-308)	G	89,5			83,7
	A	10,5			16,3
	G/G	79,6			67,4
	G/A	18,8			32,6
	A/A	1,7			0
IL-10 (–819)	C	65,7			69,0
	T	34,3			31,0
	C/C	45,3			45,2
	C/T	41,4			46,7
	T/T	13,3			8,1
IL-10 (-592)	C	65,7			70,0
	A	34,3			30,0
	C/C	45,3			48,0
	C/A	41,4			44,0
	A/A	13,3			8,0
IFNγ (+874)	T	38,1	41,0	42,0	
	A	61,9	59,0	58,0	
	T/T	17,1	18,0	25,0	
	T/A	42,0	45,0	33,0	
	A/A	40,9	37,0	41,0	

8.2 **Polimorfismos de citocinas na população Brasileira**

Adicionalmente, nós comparamos a distribuição dos alelos e genótipos na nossa população com amostras de população de três outras regiões do Brasil: uma amostra abrangendo as cidades de Campinas (São Paulo - região Sudeste) e Maringá (Paraná - região Sul) (129); e outra amostra da cidade de Salvador (Bahia – Nordeste do Brasil) (91) (Tabela 8). Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos SNPs em TNF-α(-308), TGF-β (códon10), IL-10(-592,-819,-

1082), IL-6(-174) e IFN-γ(+874). Entretanto, em TGF-β (códon 25) as freqüências alélica e genotípica foram estatisticamente diferentes entre as populações do Rio de Janeiro e Bahia (p=0,004 e p=0,002, respectivamente). Nós também pudemos observar uma diferença na distribuição alélica entre as populações de São Paulo/Paraná e Bahia em TGF-β (códon25) (p=0,0003) e IL-6 (-174) (p=0,013). Igualmente, a distribuição genotípica de TGF-β foi significativamente diferente entre São Paulo/Paraná e Bahia (p=0,0004).

As populações do Rio de Janeiro e São Paulo/Paraná são semelhantes entre si quanto à distribuição dos SNPs estudados, e ambas diferem da população da Bahia em alguns polimorfismos (TGF-β e IL-6). Esta diferença pode ser resultado da composição étnica de cada uma dessas regiões. De acordo com o IBGE, São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro são estados com predominância de brancos (70%, 80% e 60%, respectivamente). O inverso ocorre na Bahia, onde 82% da população é considerada mulata/negra (Laeser, IE-UFRJ - http://www.laeser.ie.ufrj.br/). Isso poderia explicar o porque a população da Bahia possuir distribuição de polimorfismos diferente das populações do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná.

Uma vez que foram observadas diferenças significativas entre as populações de diferentes regiões do Brasil, nós comparamos os grupos étnicos (brancos, mulatos e negros) do Rio de Janeiro com as populações de São Paulo/Paraná e Bahia (Tabela 9).

A distribuição alélica e genotípica na população da Bahia mostrou-se significativamente diferente de: mulatos em TGF-β (códon 25) (p=0,002 e p=0,003, respectivamente); brancos em IL-6 (-174) (p=0,006 e p=0,039, respectivamente); e negros em IL-6 (-174) (p=0,014 e p=0,03, respectivamente). Além disso, os Brancos possuem uma maior freqüência do genótipo IFN-γ (+874) TT do que a população da Bahia (p=0,04). A comparação com a população de São Paulo/Paraná revelou uma diferença predominante com relação aos negros. A distribuição alélica e genotípica foi estatisticamente diferente em IFN-γ (+874) (p=0,006 e p=0,008, respectivamente); em IL-6 (-174) (p<0,0001 e p=0,008, respectivamente); e ainda em IL-10 (-592 e –819) (p=0,015 e p=0,038, respectivamente).

Tabela 8: Porcentagem da distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de citocinas nas populações do Rio de Janeiro (RJ), São Paulo/Paraná (SP/PR) e Bahia (BA).

SNP	Alelo/ Genótipo	Rio de Janeiro (n=181)	São Paulo/Paraná (n=211)	Bahia (n=94)	P
TNFα (-308)	G	89,5	86,9	88,8	
	A	10,5	13,1	11,2	
	G/G	79,6	73,8	77,7	
	G/A	18,8	26,2	22,3	
	A/A	1,7	0	0	
TGFβ1 (Códon 10)	T	57,2	56,9	48,4	
	C	42,8	43,1	51,6	
	T/T	29,8	30,3	22,4	
	T/C	52,5	53,1	52,1	
	C/C	17,7	16,6	25,5	
TGFβ1 (Códon 25)	G	92,0	93,4	83,5	RJ x BA: p=0,004 SP/PR x BA: p=0,0003)
	C	8,0	6,6	16,5	
	G/G	85,1	87,2	68,1	
	G/C	13,8	12,3	30,8	RJ x BA: p=0,002 SP/PR x BA: p=0,0004
	C/C	1,1	0,5	1,1	
IL-10 (-1082)	A	67,7	61,4	63,3	
	G	32,3	38,6	36,7	
	A/A	49,2	39,3	40,4	
	G/A	37,0	44,1	45,8	
	G/G	13,8	16,6	13,8	
IL-10 (-819)	C	65,7	68,2	63,8	
	T	34,3	31,8	36,2	
	C/C	45,3	46,4	38,3	
	C/T	41,4	43,6	51,1	
	T/T	13,3	10,0	10,6	
IL-10 (-592)	C	65,7	68,2	63,8	
	A	34,3	31,8	36,2	
	C/C	45,3	46,4	38,3	
	C/A	41,4	43,6	51,1	
	A/A	13,3	10,0	10,6	
IL-6 (-174)	G	75,7	69,7	79,8	SP/PR x BA: p=0,013
	C	24,3	30,3	20,2	
	G/G	57,5	49,3	63,8	
	G/C	35,9	40,8	31,9	
	C/C	6,6	9,9	4,3	
IFNγ (+874)	T	38,1	41,2	33,5	
	A	61,9	58,8	66,5	
	T/T	17,1	14,2	9,6	
	T/A	42,0	54,0	47,8	
	A/A	40,9	31,8	42,6	

Surpreendentemente, a freqüência de alguns polimorfismos em grupos étnicos difere das outras populações analisadas. Sabe-se que Brasil é um país extremamente heterogêneo. Além da mistura entre portugueses, índios e negros africanos, uma intensa imigração de italianos, espanhóis, alemães, japoneses, libaneses, entre outros, ocorreu no Brasil nos séculos XIX e XX. Ao se estabelecerem em locais específicos do Brasil, estes indivíduos passaram a contribuir com seu *background* genético na população brasileira. Corroborando este fato, estudos envolvendo dois haplótipos no gene do Regulador Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR) sugerem que estes polimorfismos foram introduzidos na população brasileira por diferentes processos migratórios (133). Além disso, o Brasil é um país de dimensões continentais, com incidência de doenças características de cada região. Dessa maneira, este estudo corrobora que indivíduos de cada região possam ter sofrido pressão seletiva diferente, o que pode influenciar na freqüência dos polimorfismos (134). Mesmo assim, fomos surpreendidos com o fato de os negros do Rio de Janeiro serem estatisticamente diferentes da população da Bahia, de maioria negra.

Diferenças em grupos étnicos semelhantes dentro de uma mesma população não são novidade. Kuffner *et al* (135) demonstraram uma distribuição diferenciada nos polimorfismos genéticos de HLA e TNF-α em Afro-Americanos de diferentes regiões dos Estados Unidos. Portanto, a origem ancestral diferente, migração e inter-cruzamentos poderia explicar o porque dos negros do Rio de Janeiro serem diferentes da população da Bahia para o gene da IL-6. De fato, quando o cromossomo Y é analisado em Afro-descendentes de quatro regiões do Brasil, uma alta heterogeneidade é observada (136), provavelmente refletindo diferentes graus de mistura e pressão seletiva a que essas populações foram submetidas. Além disso, a origem étnica dos escravos recebidos no Brasil é muito variada, além de se ter alterado ao longo dos séculos de tráfico negreiro. Cada época da História do Brasil tem diferentes portos importantes de embarque de escravos, e cada porto recebia escravo proveniente de uma grande região que ia até centenas de quilômetros para o interior da África (http://www.unesco.org/culture/dialogue/slave/images/Ppdf.PDF). Assim, os grupos étnicos acabaram se dividindo por locais, com preponderância dos Bantos no Rio de Janeiro e dos negros do oeste-africano na Bahia e norte do Brasil (137). Desta maneira, a utilização de marcadores de ancestralidade, tais como o DNA

mitocondrial e o cromossomo Y aliados ao estudo dos polimorfismos de citocinas poderia ser uma ferramenta eficaz para se determinar a história evolutiva e migratória da população brasileira (138).

Com relação aos mulatos, observamos diferença significativa na distribuição dos polimorfismos em TGF-β (códon 25) quando comparada à população da Bahia e até mesmo quando comparado aos Brancos e Negros (IL-6, IL-10 e IFN-γ) da população do Rio de Janeiro. Provavelmente esta diferença se deva a uma maior influência de genes de origem ameríndia nesta população, como sugerido por Coura et al (139). Esta observação pode ser resultado de uma falha na classificação étnica, já que muitos indivíduos de características caucasóides podem ter se declarado como mulatos em função da crescente afirmação social da população brasileira em assumir suas raízes africanas. Como resultado, segundo o IBGE, o número de auto-declarados Mulatos e Negros tem aumentado nos últimos censos, e isso se deve a mudanças na declaração, e não ao aumento destes grupos propriamente dito (140).

Buscando caracterizar ainda mais os polimorfismos presentes na população do Rio de Janeiro, nós comparamos nossos resultados com os obtidos previamente por Moraes *et al*. (141). Estes autores estudaram cinco SNPs na região promotora do gene da IL-10 em 293 brasileiros da cidade do Rio de Janeiro, dos quais dois (-1082 e –819) estão demonstrados na Tabela 10. Nenhuma diferença foi observada quando comparamos a distribuição alélica e genotípica entre as duas amostras de população (dados não mostrados).

Entretanto, quando os grupos étnicos foram comparados, diferenças significativas foram observadas em IL-10 (-819). A freqüência do alelo –819C e genótipo –819CC foi menos freqüentes em negros da nossa amostra do que em Euro-Brasileiros da amostra estudada por Moraes *et al* (Figura 10). Uma vez que o desequilíbrio de ligação entre IL-10 –592 e –819 é o máximo possível (142), podemos inferir que também há diferenças entre negros e Euro-Brasileiros em IL-10 (-592).

Tabela 9: Porcentagem da distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de citocinas em Brancos (B), Mulatos (M) e Negros (N) comparados às populações de São Paulo/Paraná (SP/PR) e Bahia (BA).

SNP	Alelo/ Genótipo	Brancos (n=75)	Mulatos (n=65)	Negros (n=41)	SP/PR (n=211)	BA (n=94)	P
TNFα (-308)	G	90,0	89,2	86,6	86,9	88,8	
	A	10,0	10,8	13,4	13,1	11,2	
	G/G	81,3	81,5	73,2	73,8	77,7	
	G/A	17,3	15,4	26,8	26,2	22,3	
	A/A	1,3	3,1	0	0	0	
TGFβ1 (Códon 10)	T	52,0	58,5	59,8	56,9	48,4	
	C	48,0	51,5	40,2	43,1	51,6	
	T/T	28,0	32,3	29,3	30,3	22,4	
	T/C	48,0	52,3	61,0	53,1	52,1	
	C/C	24,0	15,4	9,8	16,6	25,5	
TGFβ1 (Códon 25)	G	89,3	95,4	91,5	93,4	83,5	M x BA: p=0,002
	C	10,7	4,6	8,5	6,6	16,5	
	G/G	80,0	90,8	85,4	87,2	68,1	
	G/C	18,7	9,2	12,2	12,3	30,8	M x BA: p=0,003
	C/C	1,3	0	2,4	0,5	1,1	
IL-10 (-1082)	A	66,7	63,1	76,8	61,4	63,3	
	G	33,3	36,9	23,2	38,6	36,7	
	A/A	50,7	40,0	61,0	39,3	40,4	
	G/A	32,0	46,2	31,7	44,1	45,8	
	G/G	17,3	13,8	7,3	16,6	13,8	
IL-10 (-819)	C	66,0	73,8	53,7	68,2	63,8	N x SP/PR: p=0,015
	T	34,0	26,2	46,3	31,8	36,2	
	C/C	45,3	56,9	26,8	46,4	38,3	
	C/T	41,3	33,8	53,7	43,6	51,1	N x SP/PR: p=0,038
	T/T	13,3	9,2	19,5	10,0	10,6	
IL-10 (-592)	C	66,0	73,8	53,7	68,2	63,8	N x SP/PR: p=0,015
	A	34,0	26,2	46,3	31,8	36,2	
	C/C	45,3	56,9	26,8	46,4	38,3	
	C/A	41,3	33,8	53,7	43,6	51,1	N x SP/PR: p=0,038
	A/A	13,3	9,2	19,5	10,0	10,6	
IL-6 (-174)	G	66,0	75,4	92,7	69,7	79,8	B x BA: p=0,006 N x BA: p=0,014 N x SP/PR: p<0,0001
	C	34,0	24,6	7,3	30,3	20,2	
	G/G	41,3	58,5	85,4	49,3	63,8	B x BA: p=0,013 N x BA: p=0,03 N x SP/PR: p<0,0001
	G/C	49,3	33,8	14,6	40,8	31,9	
	C/C	9,3	7,7	0	9,9	4,3	
IFNγ (+874)	T	44,0	40,0	24,4	41,2	33,5	N x SP/PR: p=0,006
	A	56,0	60,0	75,6	58,8	66,5	
	T/T	24,0	16,9	4,9	14,2	9,6	
	T/A	40,0	46,2	39,0	54,0	47,8	N x SP/PR: p=0,008 B x BA: p=0,04
	A/A	36,0	36,9	56,1	31,8	42,6	

Tabela 10: Porcentagem da distribuição alélica e genotípica do polimorfismo em IL-10 (-1082 e -819) na amostra de população do Rio de Janeiro observada por Moraes *et al (141)* .

SNP	Alelo/ Genótipo	Rio de Janeiro – Moraes *et al* (n=293)	Afro-Brasileiros (n=95)	Euro-Brasileiros (n=95)
IL-10 (-1082)	A	68,0	72,0	69,0
	G	32,0	28,0	31,0
	A/A	43,3	46,7	40,4
	G/A	50,9	50,0	56,4
	G/G	5,8	3,3	3,2
IL-10 (-819)	C	67,0	62,0	71,0
	T	33,0	38,0	29,0
	C/C	44,0	40,2	52,6
	C/T	44,7	43,5	37,9
	T/T	11,3	16,3	9,5

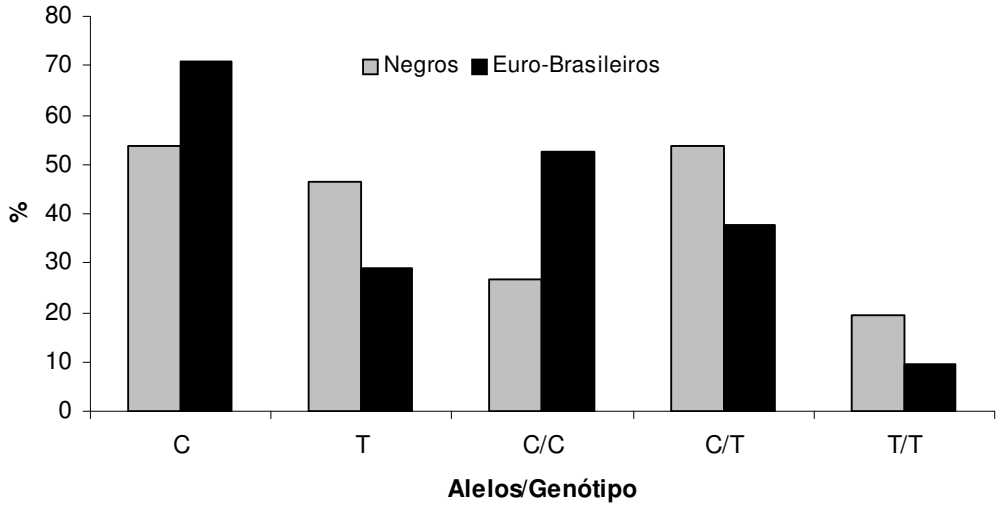

Figura 10: Porcentagem da distribuição alélica e genotípica do polimorfismo em IL-10 (-819) entre Negros e Euro-Brasileiros (Moraes et al).

Tabela 11: Porcentagem da distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos de citocinas nas populações do Rio de Janeiro (RJ), Itália (It), Eslováquia (Es) e em Afro-Americanos (AA).

SNP	Alelo/ Genótipo	Rio de Janeiro (n=181)	Itália (n=140)	Eslováquia (n=140)	Afro-Americanos (n=691)	P
TNFα (-308)	G	89,0	91,0	86,8	85,2	
	A	11,0	9,0	13,2	14,8	
	G/G	79,6	84,0	75,8	72,1	
	G/A	18,8	14,0	22,1	26,3	
	A/A	1,7	2,0	2,1	1,6	
TGFβ1 (Códon 10)	T	56,1	55,0	55,0	58,3	
	C	43,9	45,0	45,0	41,7	
	T/T	29,8	32,0	29,5	-	
	T/C	52,5	45,0	51,1	-	
	C/C	17,7	23,0	19,4	-	
TGFβ1 (Códon 25)	G	92,0	92,0	92,1	89,4	
	C	8,0	8,0	7,9	10,6	
	G/G	85,1	87,0	84,2	-	
	G/C	13,8	10,0	15,8	-	
	C/C	1,1	3,0	0	-	
IL-10 (-1082)	A	67,7	61,0	56,8	65,6	RJ x Es: p=0,006
	G	32,3	39,0	43,2	34,4	
	A/A	49,2	34,0	35,0	-	
	G/A	37,0	54,0	43,6	-	RJ x It: p=0,0068 RJ x Es: p=0,0272
	G/G	13,8	12,0	21,4	-	
IL-10 (-819)	C	66,0	72,0	73,2	59,5	RJ x AA: p=0,0446
	T	34,0	28,0	26,8	40,5	
	C/C	45,3	50,0	55,0	-	
	C/T	41,4	44,0	36,4	-	
	T/T	13,3	6,0	8,6	-	
IL-10 (-592)	C	66,0	72,0	73,2	59,5	RJ x AA: p=0,0446
	A	34,0	28,0	26,8	40,5	
	C/C	45,3	50,0	55,0	-	
	C/A	41,4	44,0	36,4	-	
	A/A	13,3	6,0	8,6	-	
IL-6 (-174)	G	75,4	66,0	61,4	92,5	RJ x It: p=0,0092 RJ x Es: p=0,0002 RJ x AA: p<0,0001
	C	24,6	34,0	38,6	7,5	
	G/G	57,5	41,0	37,9	85,5	RJ x It: p=0,012 RJ x Es: p=0,0009 RJ x AA: p<0,0001
	G/C	35,9	50,0	47,1	13,9	
	C/C	6,6	9,0	15,0	0,6	
IFNγ (+874)	T	38,1	46,5	46,8	19,6	RJ x It: p=0,0418 RJ x Es: p=0,0335 RJ x AA: p<0,0001
	A	61,9	53,5	53,2	80,4	
	T/T	17,1	23,0	22,9	5,4	
	T/A	42,0	47,0	47,9	28,6	RJ x AA: p<0,0001
	A/A	40,9	30,0	29,2	66,1	

8.3 **Polimorfismos de citocinas nas populações mundiais**

A fim de estendermos nossas comparações, nós também investigamos as diferenças na distribuição alélica entre as populações do Rio de Janeiro e duas populações européias; uma da Itália (142), uma da Eslováquia (143) e ainda uma população Afro-Americana dos Estados Unidos (144) (Tabela 11). Foram observadas diferenças na população do Rio de Janeiro em IL-6 (-174) quando comparada com as populações da Itália (p=0,0009), Eslováquia (p=0,0002) e Afro-Americanos (p<0,0001); a freqüência alélica em INF-γ (+874) na população do Rio de Janeiro foi diferente dos Italianos (p=0,04), Eslovacos (p=0,03) e Afro-Americanos (p<0,0001). A população do Rio de Janeiro também demonstrou diferenças na distribuição alélica em IL-10 (-1082) quando comparado à população da Eslováquia (p=0,006). As populações do Rio de Janeiro e Afro-Americanas são diferentes quanto à distribuição alélica em IL-10 (-592) e IL-10 (-819) (p=0,04).

Quanto à distribuição genotípica, IL-6 (-174) acompanhou a distribuição alélica e foi significativamente diferente entre as populações do Rio de Janeiro e Itália (p=0,012), Eslováquia (p=0,0009) e Afro-Americana (p<0,0001). Além disso, o genótipo IL-10 (-1082) AA foi mais freqüente na população do Rio de Janeiro quando comparado a Italianos (p=0,002) e Eslovacos (p=0,02). A distribuição genotípica entre a população do Rio de Janeiro e Afro-Americanos não foi comparada.

Nossa população possui distribuição de polimorfismos diferentes de populações preponderantemente brancas e homogêneas como Itália e Eslováquia. Mais uma vez foi demonstrado que populações caucasóides homogêneas possuem menor freqüência do alelo G na região –174 do gene da IL-6 do que populações heterogêneas (145, 146). Esta diferença provavelmente se deve à influência da ancestralidade negra, uma vez que negros norte-americanos possuem freqüência ainda menor do que a população brasileira. Ao comparar mulheres brancas norte-americanas com Afro-Americanas, Hassan *et al* (147) observaram que o genótipo IL-6(-174)GG era maior em Afro-Americanas (86%) do que em mulheres brancas (33%).

8.4 **Análise haplotípica e fenotípica**

A relação entre o genótipo e a produção *in vivo* tem sido pesquisada há muitos anos (148). Em indivíduos saudáveis, níveis mais altos de produção têm sido mais freqüentes em algumas citocinas, ocorrendo o inverso para outras citocinas. Assim, a presença de um genótipo pode determinar o nível de produção da citocina (Quadro 3).

Para as citocinas estudadas neste trabalho, nós distinguimos entre produção alta, intermediária e baixa para as citocinas TGF-β, IL-10 e IFN-γ; e somente produção alta e baixa para os genes IL-6 e TNF-α. Ao analisar a distribuição destes genótipos de acordo com a produção, nenhuma diferença entre os grupos étnicos do Rio de Janeiro foi observada (Tabela 12).

Quadro 3: Relação entre o genótipo e os níveis de produção de citocinas.

Citocina	Haplótipo	Produção
TNFα (-308)	G/G	Baixo
	G/A	Alto
	A/A	Alto
TGFβ1 (Códons 10 e 25)	T/T G/G	Alto
	T/C G/G	Alto
	T/C G/C	Intermediário
	C/C G/G	Intermediário
	T/T G/C	Intermediário
	C/C G/C	Baixo
	C/C C/C	Baixo
	T/T C/C	Baixo
	T/C C/C	Baixo
IL-10 (-1082, -819, -592)	GCC/GCC	Alto
	GCC/ACC	Intermediário
	GCC/ATA	Intermediário
	ACC/ACC	Baixo
	ACC/ATA	Baixo
	ATA/ATA	Baixo
IL-6 (-174)	G/G	Alto
	G/C	Alto
	C/C	Baixo
IFNγ (+874)	T/T	Alto
	T/A	Intermediário
	A/A	Baixo

Tabela 12: Distribuição dos polimorfismos de acordo com os níveis de produção em Branco, Mulatos e Negros no Rio de Janeiro.

Citocina	Produção	Brancos (n=75)	Mulatos (n=65)	Negros (n=41)
TNFα (-308)	Alto	18,6	18,5	26,8
	Baixo	81,3	81,5	73,2
TGFβ1 (Códons 10 e 25)	Alto	66,7	80,0	78,0
	Intermediário	22,7	15,4	19,5
	Baixo	10,7	4,6	2,4
IL-10 (-1082, -819, -592)	Alto	17,3	13,8	7,3
	Intermediário	32,0	46,2	31,7
	Baixo	50,7	40,0	61,0
IL-6 (-174)	Alto	90,7	92,3	100,0
	Baixo	9,3	5,0	0
IFNγ (+874)	Alto	24,0	16,9	4,9
	Intermediário	40,0	46,2	39,0
	Baixo	36,0	36,9	56,1

Então, nós comparamos a distribuição dos genótipos, de acordo com a produção, da população do Rio de Janeiro com outras populações previamente estudadas. Selecionamos três estudos cujas técnicas e análises se assemelhavam ao nosso trabalho. Assim, comparações foram feitas com uma população do estado da Bahia (91), da Itália (142) e Afro-Americanos dos Estados Unidos (144) (Tabela 13). Diferenças significativas foram observadas em IL-10, já que a população do Rio de Janeiro apresenta uma maior freqüência de genótipos que conferem baixa produção de citocinas do que as populações da Itália (p=0,0062) e Afro-Americanos (p=0,03). Foram observadas ainda diferenças significativas em TNF-α (Rio de Janeiro vs. Afro-Americanos; p=0,0387), em TGF-β (Rio de Janeiro vs. Bahia; p=0,0008), em IL-6 (Rio de Janeiro vs. Afro-Americanos; p<0,0001) e, finalmente, em IFN-γ (Rio de Janeiro vs. Afro-Americanos; p<0,0001).

Particularmente em TGF-β (códons 10 e 25) e IL-10 (-1082, -819 e –592), tais SNPs podem, potencialmente, se combinar e influenciar na quantidade de citocina produzida. No gene do TGF-β, os genótipos podem gerar nove haplótipos possíveis. Já os SNPs em IL-10 combinados podem gerar seis possíveis haplótipos.

A tabela 14 mostra a freqüência de cada um desses haplótipos nas populações do Rio de Janeiro, Itália e Afro-Americanos. Não há diferença significativa na freqüência destes haplótipos no gene do TGF-β entre as populações estudadas. No entanto, a distribuição haplotípica de IL-10 na população residente no Rio de Janeiro

é estatisticamente diferente da população Italiana (p=0,0293) e da Afro-Americana (p=0,0025).

Tabela 13: Distribuição dos polimorfismos de acordo com os níveis de produção nas populações de Rio de Janeiro (RJ), Bahia (BA), Itália (It) e Afro-Americanos (AA).

Citocina	Produção	Rio de Janeiro (n=181)	Bahia (n=94)	Itália (n=140)	Afro-Americanos (n=691)	P
TNFα (-308)	Baixo	79,6	77,7	84,0	72,1	RJ x AA: p=0,0387
	Alto	20,4	22,3	16,0	27,9	
TGFβ1 (Códons 10 e 25)	Alto	74,0	52,1	70,0	70,5	
	Intermediário	19,3	38,3	24,4	21,6	RJ x BA: p=0,0008
	Baixo	6,6	9,6	6,6	7,9	
IL-10 (-1082, -819, -592)	Alto	13,8	13,8	12,0	10,3	
	Intermediário	37,0	45,8	55,0	48,1	RJ x It: p=0,0062 RJ x AA: p=0,03
	Baixo	49,2	40,4	33,0	41,6	
IL-6 (-174)	Alto	93,4	95,7	91,0	99,4	RJ x AA: p<0,0001
	Baixo	6,6	4,3	9,0	0,6	
IFNγ (+874)	Alto	17,1	9,6	23,0	5,4	
	Intermediário	42,0	47,9	47,0	28,6	RJ x AA: p<0,0001
	Baixo	40,9	42,5	30,0	66,1	

8.5 **A influência do genótipo sobre a produção de citocinas**

Uma possível razão para a alta freqüência de um genótipo associado com uma dada taxa de produção é a seleção natural ao longo da evolução, aumentando a freqüência de genótipos mais vantajosos. Conseqüentemente, diferentes populações tendem a exibir diferenças quanto à freqüência de genótipos que conferem alta ou baixa produção de citocinas. Das populações estudadas, os Afro-Americanos foram os que mais se diferenciaram da população do Rio de Janeiro. De uma maneira geral, populações caucasóides possuem a mesma freqüência de genótipos que conferem alta produção de IL-10, porém, freqüências mais altas quando comparadas a populações Negras ou Asiáticas (149, 150).

Tabela 14: Distribuição dos polimorfismos de acordo com haplótipos de TGF-β e IL-10 nas populações de Rio de Janeiro (RJ), Itália (It) e Afro-Americanos (AA).

Citocina	Haplótipo	Rio de Janeiro (n=181)	Itália (n=140)	Afro-Americanos (n=691)	P
TGFβ1 (Códons 10 e 25)	T/T G/G	30,9	32,0	30,5	
	T/C G/G	43,6	38,0	39,9	
	T/C G/C	8,3	7,0	8,2	
	C/C G/G	11,0	17,0	11,7	
	T/T G/C	0	0	1,6	
	C/C G/C	5,0	3,0	4,6	
	C/C C/C	1,1	3,0	1,2	
	T/T C/C	0	0	2,0	
	T/C C/C	0	0	0,1	
IL-10 (-1082, -819, -592)	GCC/GCC	13,8	12,0	10,3	
	GCC/ACC	19,9	31,0	18,4	
	GCC/ATA	17,7	24,0	29,8	RJ x It: p=0,0293 RJ x AA: p=0,0025
	ACC/ACC	11,0	7,0	5,1	
	ACC/ATA	24,3	21,0	21,7	
	ATA/ATA	13,3	5,0	14,8	

Quanto ao TGF-β, a maioria das populações apresenta genótipos relativos à alta produção da citocina (144144, 151, 152). Em nossas comparações, constatamos que a população da Bahia possui menor freqüência de altos produtores de TGF-β.

9 **CONCLUSÕES**

Este estudo genético de citocinas nos traz informações importantes sobre seus polimorfismos e conseqüentemente nos mostra uma possível relação entre os polimorfismos e a seleção natural. Além disso, a relação dos genótipos de citocinas com doenças e fenômenos imunológicos, tais como reação a transplantes e doenças autoimunes, pode nos ajudar a entender os eventos biológicos envolvidos e indicar um caminho no qual poderemos prever, prevenir ou controlar os danos causados por doenças cujos componentes imunológicos estejam envolvidos. Nossos dados poderão ser úteis para futuros estudos envolvendo associação de polimorfismos de citocinas com doenças ou transplantes na população brasileira.

De acordo com nossas observações, podemos concluir que:

- Os polimorfismos em IL-10, IL-6 e IFN-γ são distribuídos de acordo com a ancestralidade na população brasileira no Rio de Janeiro.
- As populações do Rio de Janeiro e Bahia possuem freqüências alélicas e genotípicas de TGF-β (códon 25) estatisticamente diferentes, mas as populações de Rio de Janeiro e São Paulo/Paraná possuem distribuição dos polimorfismos de citocinas semelhantes.
- A população do Rio de Janeiro difere das populações européias e de Afro-americanos quanto à distribuição dos polimorfismos genéticos de citocinas em IL-10 (-1082, -819 e –592), IL-6 e IFN-γ.
- Nossas observações poderão ser úteis para futuros estudos e associação entre polimorfismos genéticos de citocinas e doenças na população brasileira.

REFERÊNCIAS

1. Goebel T, Waters MR, O'Rourke DH. The late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. Science (New York, NY. 2008 Mar 14;319(5869):1497-502.
2. Prado C. A Formação do Brasil Contemporâneo: Braziliense; 1945.
3. Freyre G. Casa Grande e Senzala: Global; 2003.
4. IBGE. Brasil: 500 Anos de Povoamento: Editora IBGE; 2000.
5. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. Am J Hum Genet. 2001 Jan;68(1):281-6.
6. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. Am J Hum Genet. 2000 Aug;67(2):444-61.
7. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 7;100(1):177-82.
8. Silva DA, Carvalho E, Costa G, Tavares L, Amorim A, Gusmao L. Y-chromosome genetic variation in Rio de Janeiro population. Am J Hum Biol. 2006 Nov-Dec;18(6):829-37.
9. Pena SC-S, D; Alves-Siva, J; Prado, VF; Santos, FR. Retrato Molecular do Brasil. Ciência Hoje. 2001:16-25.
10. Thakkinstian A, Dmitrienko S, Gerbase-Delima M, McDaniel DO, Inigo P, Chow KM, et al. Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. Nephrol Dial Transplant. 2008 Sep;23(9):3017-23.
11. Ollier WE. Cytokine genes and disease susceptibility. Cytokine. 2004 Nov 21-Dec 7;28(4-5):174-8.
12. Janeway CAJ; Murphy K TP, Walport M. Immunobiology. New York, USA: Garland Science; 2008.
13. Chelbi-Alix MK, Wietzerbin J. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. Biochimie. 2007 Jun-Jul;89(6-7):713-8.
14. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. J Allergy Clin Immunol. 2008 May;121(5):1108-11.
15. Abbas AK LA. Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
16. Brookes AJ. The essence of SNPs. Gene. 1999 Jul 8;234(2):177-86.
17. Aguillon JC, Cruzat A, Aravena O, Salazar L, Llanos C, Cuchacovich M. Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution? Immunobiology. 2006;211(1-2):75-84.

18. Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. Am J Transplant. 2002 Jul;2(6):560-7.

19. Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. Genes Immun. 2006 Jun;7(4):269-76.

20. Kubistova Z, Mrazek F, Tudos Z, Kriegova E, Ambruzova Z, Mytilineos J, et al. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population. International journal of immunogenetics. 2006 Aug;33(4):261-7.

21. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. Cytokine & growth factor reviews. 2005 Feb;16(1):35-53.

22. Susa S, Daimon M, Sakabe J, Sato H, Oizumi T, Karasawa S, et al. A functional polymorphism of the TNF-alpha gene that is associated with type 2 DM. Biochemical and biophysical research communications. 2008 May 9;369(3):943-7.

23. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. The Journal of pathology. 2008 Jan;214(2):149-60.

24. Wirz SA, Morale MC, Marchetti B, Barr AM, Sotgiu S, Rosati G, et al. High frequency of TNF alleles -238A and -376A in individuals from northern Sardinia. Cytokine. 2004 May 21;26(4):149-54.

25. Bertazza L, Mocellin S. Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. Front Biosci. 2008;13:2736-43.

26. Taylor AW. Review of the activation of TGF-{beta} in immunity. Journal of leukocyte biology. 2009 Jan;85(1):29-33.

27. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. Cell. 2008 Aug 8;134(3):392-404.

28. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annu Rev Immunol. 2006;24:99-146.

29. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell research. 2009 Feb;19(2):156-72.

30. Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, Ask K, Kolb M. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. Biochemical Society transactions. 2007 Aug;35(Pt 4):661-4.

31. Decologne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, et al. TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. J Immunol. 2007 Nov 1;179(9):6043-51.

32. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. Transplantation. 1998 Oct 27;66(8):1014-20.

33. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. European cytokine network. 1996 Sep;7(3):363-74.

34. Massague J. The transforming growth factor-beta family. Annu Rev Cell Biol. 1990;6:597-641.

35. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. Genes Dev. 1994 Jan;8(2):133-46.

36. Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2002 Feb;316(1-2):83-94.

37. Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. Immunological reviews. 2008 Dec;226:219-33.

38. Blackburn SD, Wherry EJ. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. Trends in microbiology. 2007 Apr;15(4):143-6.

39. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annual review of immunology. 2001;19:683-765.

40. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet. 1997 Feb;24(1):1-8.

41. Oleksyk TK, Thio CL, Truelove AL, Goedert JJ, Donfield SM, Kirk GD, et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the IL10 region associated with HCV clearance. Genes and immunity. 2005 Jun;6(4):347-57.

42. Noma Y, Sideras P, Naito T, Bergstedt-Lindquist S, Azuma C, Severinson E, et al. Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter. Nature. 1986 Feb 20-26;319(6055):640-6.

43. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. Annual review of immunology. 2005;23:1-21.

44. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. Nature clinical practice. 2006 Nov;2(11):619-26.

45. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. Clinical immunology (Orlando, Fla. 2009 Jan;130(1):27-33.

46. Ferguson-Smith AC, Chen YF, Newman MS, May LT, Sehgal PB, Ruddle FH. Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. Genomics. 1988 Apr;2(3):203-8.

47. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest. 1998 Oct 1;102(7):1369-76.

48. Belluco C, Olivieri F, Bonafe M, Giovagnetti S, Mammano E, Scalerta R, et al. -174 G>C polymorphism of interleukin 6 gene promoter affects interleukin 6 serum level in patients with colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2003 Jun;9(6):2173-6.

49. Wheelock EF. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. Science (New York, NY. 1965 Jul 16;149:310-1.

50. Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C, et al. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. Science (New York, NY. 1995 Jul 14;269(5221):245-7.

51. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Advances in immunology. 2007;96:41-101.

52. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. Annual review of immunology. 1997;15:749-95.

53. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. Journal of leukocyte biology. 2004 Feb;75(2):163-89.

54. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. Human immunology. 2000 Sep;61(9):863-6.

55. Jeng JE, Tsai JF, Chuang LY, Ho MS, Lin ZY, Hsieh MY, et al. Tumor necrosis factor-alpha 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. Neoplasia. 2007 Nov;9(11):987-92.

56. Zhang J, Dou C, Song Y, Ji C, Gu S, Xie Y, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with increased susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. J Hum Genet. 2008;53(6):479-89.

57. Lu Z, Chen L, Li H, Zhao Y, Lin L. Effect of the polymorphism of tumor necrosis factor-alpha-308 G/A gene promoter on the susceptibility to ulcerative colitis: a meta-analysis. Digestion. 2008;78(1):44-51.

58. Mamyrova G, O'Hanlon TP, Sillers L, Malley K, James-Newton L, Parks CG, et al. Cytokine gene polymorphisms as risk and severity factors for juvenile dermatomyositis. Arthritis Rheum. 2008 Dec;58(12):3941-50.

59. Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. Hum Mol Genet. 2003 Oct 1;12(19):2541-6.

60. Falleti E, Fabris C, Toniutto P, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, et al. TGF-beta1 genotypes in cirrhosis: relationship with the occurrence of liver cancer. Cytokine. 2008 Nov;44(2):256-61.

61. Nattermann J, Vogel M, Nischalke HD, Danta M, Ahlenstiel G, Michalk M, et al. The transforming growth factor-beta high-producer genotype is associated with response to hepatitis C virus-specific therapy in HIV-positive patients with acute hepatitis C. Aids. 2008 Jul 11;22(11):1287-92.

62. Gomez-Mateo J, Marin L, Lopez-Alvarez MR, Moya-Quiles MR, Miras M, Marin-Moreno I, et al. TGF-beta1 gene polymorphism in liver graft recipients. Transpl Immunol. 2006 Dec;17(1):55-7.

63. Farhat K, Hassen E, Gabbouj S, Bouaouina N, Chouchane L. Interleukin-10 and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with nasopharyngeal carcinoma. Int J Immunogenet. 2008 Jun;35(3):197-205.

64. Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, et al. The interleukin-10 (-1082A/G) polymorphism is strongly associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. Anticancer Res. 2008 Jan-Feb;28(1A):309-14.

65. Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X, et al. Interleukin-10 -1082 promoter polymorphism associated with gastric cancer among Asians. Eur J Cancer. 2008 Nov;44(17):2648-54.

66. Truelove AL, Oleksyk TK, Shrestha S, Thio CL, Goedert JJ, Donfield SM, et al. Evaluation of IL10, IL19 and IL20 gene polymorphisms and chronic hepatitis B infection outcome. Int J Immunogenet. 2008 Jun;35(3):255-64.

67. Farzaneh F, Roberts S, Mandal D, Ollier B, Winters U, Kitchener HC, et al. The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. Bjog. 2006 Aug;113(8):961-4.

68. Ouma C, Davenport GC, Were T, Otieno MF, Hittner JB, Vulule JM, et al. Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production. Hum Genet. 2008 Dec;124(5):515-24.

69. Movahedi M, Mahdaviani SA, Rezaei N, Moradi B, Dorkhosh S, Amirzargar AA. IL-10, TGF-beta, IL-2, IL-12, and IFN-gamma cytokine gene polymorphisms in asthma. J Asthma. 2008 Nov;45(9):790-4.

70. Costa GC, Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, et al. Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy. J Infect Dis. 2009 Feb 1;199(3):451-4.

71. Kesarwani P, Ahirwar DK, Mandhani A, Mittal RD. Association between -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and progression of prostate cancer in North Indian population. DNA Cell Biol. 2008 Sep;27(9):505-10.

72. Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L, Faber E, Onderkova J, Kriegova E, et al. Association of IL-6 gene polymorphism with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Czech patients. Int J Immunogenet. 2008 Aug;35(4-5):401-3.

73. Minton EJ, Smillie D, Smith P, Shipley S, McKendrick MW, Gleeson DC, et al. Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes. Hum Immunol. 2005 Feb;66(2):127-32.

74. Nattermann J, Vogel M, Berg T, Danta M, Axel B, Mayr C, et al. Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfected patients. Hepatology. 2007 Oct;46(4):1016-25.

75. Chang YH, Huang CN, Shiau MY. The C-174G promoter polymorphism of the interleukin-6 (IL-6) gene that affects insulin sensitivity in Caucasians is not

involved in the pathogenesis of Taiwanese type 2 diabetes mellitus. Eur Cytokine Netw. 2004 Apr-Jun;15(2):117-9.

76. Chen J, Liu X. The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications. Cell Immunol. 2009;254(2):85-90.

77. Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. Human genetics. 2008 Jun;123(5):477-84.

78. Dai CY, Chuang WL, Chang WY, Chen SC, Lee LP, Hsieh MY, et al. Polymorphisms in the interferon-gamma gene at position +874 in patients with chronic hepatitis C treated with high-dose interferon-alpha and ribavirin. Antiviral research. 2005 Aug;67(2):93-7.

79. Dickinson AM, Holler E. Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD. Best practice & research. 2008 Jun;21(2):149-64.

80. Zabaleta J, Schneider BG, Ryckman K, Hooper PF, Camargo MC, Piazuelo MB, et al. Ethnic differences in cytokine gene polymorphisms: potential implications for cancer development. Cancer Immunol Immunother. 2008 Jan;57(1):107-14.

81. Guzman VB, Morgun A, Shulzhenko N, Mine KL, Goncalves-Primo A, Musatti CC, et al. Characterization of CD28, CTLA4, and ICOS polymorphisms in three Brazilian ethnic groups. Human immunology. 2005 Jul;66(7):773-6.

82. Hounie AG, Cappi C, Cordeiro Q, Sampaio AS, Moraes I, Rosario MC, et al. TNF-alpha polymorphisms are associated with obsessive-compulsive disorder. Neuroscience letters. 2008 Sep 12;442(2):86-90.

83. Viel DO, Tsuneto LT, Sossai CR, Lieber SR, Marques SB, Vigorito AC, et al. IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Scandinavian journal of immunology. 2007 Dec;66(6):703-10.

84. Ramasawmy R, Fae KC, Spina G, Victora GD, Tanaka AC, Palacios SA, et al. Association of polymorphisms within the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha with clinical outcomes of rheumatic fever. Molecular immunology. 2007 Mar;44(8):1873-8.

85. Xavier GM, de Sa AR, Guimaraes AL, da Silva TA, Gomez RS. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2007 Sep;36(8):476-81.

86. Guimaraes AL, Correia-Silva Jde F, Sa AR, Victoria JM, Diniz MG, Costa Fde O, et al. Investigation of functional gene polymorphisms IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha in individuals with recurrent aphthous stomatitis. Archives of oral biology. 2007 Mar;52(3):268-72.

87. Bozzi A, Pereira PP, Reis BS, Goulart MI, Pereira MC, Pedroso EP, et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. Human immunology. 2006 Nov;67(11):931-9.

88. Vanderborght PR, Matos HJ, Salles AM, Vasconcellos SE, Silva-Filho VF, Huizinga TW, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -238 and -308

positions in the TNFalpha promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 2004 Jun;72(2):143-8.

89. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. The Journal of infectious diseases. 2002 Dec 1;186(11):1687-91.

90. Padovani JC, Pazin-Filho A, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA, Franco RF. Gene polymorphisms in the TNF locus and the risk of myocardial infarction. Thrombosis research. 2000 Nov 15;100(4):263-9.

91. Pereira FA, Pinheiro da Silva NN, Rodart IF, Carmo TM, Lemaire DC, Reis MG. Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection. Journal of medical virology. 2008 Jan;80(1):58-64.

92. Bendicho MT, Guedes JC, Silva NN, Santana GO, dos Santos RR, Lyra AC, et al. Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis. Pancreas. 2005 May;30(4):333-6.

93. de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Line SR. Analysis of the TGF-beta1 promoter polymorphism (C-509T) in patients with chronic periodontitis. Journal of clinical periodontology. 2003 Jun;30(6):519-23.

94. Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB, Jr., Martins W, Jr., Assis GF, et al. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. Journal of leukocyte biology. 2008 Dec;84(6):1565-73.

95. Cordeiro CA, Moreira PR, Andrade MS, Dutra WO, Campos WR, Orefice F, et al. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. Investigative ophthalmology & visual science. 2008 May;49(5):1979-82.

96. da Silva GN, Bacchi MM, Rainho CA, de Oliveira DE. Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma. Archives of pathology & laboratory medicine. 2007 Nov;131(11):1691-6.

97. Daher S, Sass N, Oliveira LG, Mattar R. Cytokine genotyping in preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 2006 Feb;55(2):130-5.

98. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. Genes and immunity. 2004 Nov;5(7):592-5.

99. de Oliveira WR, Rady PL, Grady J, Hughes TK, Festa Neto C, Rivitti EA, et al. Polymorphisms of the interleukin 10 gene promoter in patients from Brazil with epidermodysplasia verruciformis. Journal of the American Academy of Dermatology. 2003 Oct;49(4):639-43.

100. Gadelha SR, Junior Alcantara LC, Costa GC, Acosta AX, Rios D, Kashima S, et al. Correlation between polymorphisms at interleukin-6 but not at

interleukin-10 promoter and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazilian individuals. Journal of medical virology. 2008 Dec;80(12):2141-6.

101. Tonet AC, Karnikowski M, Moraes CF, Gomes L, Karnikowski MG, Cordova C, et al. Association between the -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al. 2008 Jan;41(1):47-53.

102. de Sa AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. International endodontic journal. 2007 Jul;40(7):563-72.

103. Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. Clinical and experimental immunology. 2007 Apr;148(1):119-26.

104. Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. The Journal of infectious diseases. 2006 Aug 15;194(4):519-27.

105. Nogueira de Souza NC, Brenna SM, Campos F, Syrjanen KJ, Baracat EC, Silva ID. Interleukin-6 polymorphisms and the risk of cervical cancer. Int J Gynecol Cancer. 2006 May-Jun;16(3):1278-82.

106. Laguila Visentainer JE, Lieber SR, Lopes Persoli LB, Dutra Marques SB, Vigorito AC, Penteado Aranha FJ, et al. Relationship between cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. Cytokine. 2005 Nov 3;32(3-4):171-7.

107. von Linsingen R, Bompeixe EP, Bicalho Mda G. A case-control study in IL6 and TGFB1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion in southern Brazilian patients. Am J Reprod Immunol. 2005 Feb;53(2):94-9.

108. Pereira NF, Hansen JA, Lin MT, Roxo VM, Braun K, Petzl-Erler ML. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. Cytokine. 2004 Dec 21;28(6):233-41.

109. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Jr., de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. Journal of clinical periodontology. 2003 May;30(5):438-42.

110. Guzman VB, Yambartsev A, Goncalves-Primo A, Silva ID, Carvalho CR, Ribalta JC, et al. New approach reveals CD28 and IFNG gene interaction in the susceptibility to cervical cancer. Human molecular genetics. 2008 Jun 15;17(12):1838-44.

111. Amim LH, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredo CS, Rabahi MF, Melo MH, et al. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the

tuberculosis outcome among Brazilians subjects. Molecular biology reports. 2008 Dec;35(4):563-6.

112. Bittencourt PL, Farias AQ, Porta G, Cancado EL, Miura I, Pugliese R, et al. Frequency of concurrent autoimmune disorders in patients with autoimmune hepatitis: effect of age, gender, and genetic background. Journal of clinical gastroenterology. 2008 Mar;42(3):300-5.

113. Menezes NG, Colombo AP. Lack of association between the TNF-alpha -308 (G/A) genetic polymorphism and periodontal disease in Brazilians. Brazilian oral research. 2008 Oct-Dec;22(4):322-7.

114. Maria de Freitas N, Imbronito AV, Neves AC, Nunes FD, Pustiglioni FE, Lotufo RF. Analysis of IL-1A(-889) and TNFA(-308) gene polymorphism in Brazilian patients with generalized aggressive periodontitis. European cytokine network. 2007 Sep;18(3):142-7.

115. Guimaraes AL, Correia-Silva Jde F, Diniz MG, Xavier GM, Horta MC, Gomez RS. Investigation of functional gene polymorphisms: IL-1B, IL-6 and TNFA in benign migratory glossitis in Brazilian individuals. J Oral Pathol Med. 2007 Oct;36(9):533-7.

116. Duch CR, Figueiredo MS, Ribas C, Almeida MS, Colleoni GW, Bordin JO. Analysis of polymorphism at site -174 G/C of interleukin-6 promoter region in multiple myeloma. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al. 2007 Feb;40(2):265-7.

117. Lobo Gatti L, Zambaldi Tunes M, de Labio RW, Silva LC, de Arruda Cardoso Smith M, Marques Payao SL. Interleukin-6 polymorphism and Helicobacter pylori infection in Brazilian adult patients with chronic gastritis. Clinical and experimental medicine. 2005 Oct;5(3):112-6.

118. Campos MI, Godoy dos Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants. Implant dentistry. 2005 Dec;14(4):391-6.

119. Dos Santos MC, Campos MI, Souza AP, Scarel-Caminaga RM, Mazzonetto R, Line SR. Analysis of the transforming growth factor-beta 1 gene promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. Implant dentistry. 2004 Sep;13(3):262-9.

120. Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, et al. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. BMC infectious diseases. 2007;7:33.

121. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997 Apr 1;94(7):3195-9.

122. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. Eur J Immunogenet. 1999 Feb;26(1):1-3.

123. He B, Xu C, Yang B, Landtblom AM, Fredrikson S, Hillert J. Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis. Journal of neuroimmunology. 1998 Jun 1;86(1):13-9.

124. Franceschi C, Motta L, Valensin S, Rapisarda R, Franzone A, Berardelli M, et al. Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? Italian Multicenter Study on Centenarians (IMUSCE). Aging (Milan, Italy). 2000 Apr;12(2):77-84.

125. Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafe M, et al. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. Genes and immunity. 2002 Feb;3(1):30-3.

126. Paladino N, Fainboim H, Theiler G, Schroder T, Munoz AE, Flores AC, et al. Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. Journal of virology. 2006 Sep;80(18):9144-50.

127. Goncalves VF, Carvalho CM, Bortolini MC, Bydlowski SP, Pena SD. The phylogeography of African Brazilians. Human heredity. 2008;65(1):23-32.

128. Domingues PM, Gusmao L, da Silva DA, Amorim A, Pereira RW, de Carvalho EF. Sub-Saharan Africa descendents in Rio de Janeiro (Brazil): population and mutational data for 12 Y-STR loci. International journal of legal medicine. 2007 May;121(3):238-41.

129. Visentainer JE, Sell AM, da Silva GC, Cavichioli AD, Franceschi DS, Lieber SR, et al. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. Int J Immunogenet. 2008 Aug;35(4-5):287-93.

130. Rossini A, Lima SS, Rapozo DC, Faria M, Albano RM, Pinto LF. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al. 2006 Feb;39(2):195-201.

131. Teixeira RL, Miranda AB, Pacheco AG, Lopes MQ, Fonseca-Costa J, Rabahi MF, et al. Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. Mutation research. 2007 Nov 1;624(1-2):31-40.

132. Yeh E, Kimura L, Errera FI, Angeli CB, Mingroni-Netto RC, Silva ME, et al. Association of polymorphisms at the ADIPOR1 regulatory region with type 2 diabetes and body mass index in a Brazilian population with European or African ancestry. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al. 2008 Jun;41(6):468-72.

133. Cabello GM, Cabello PH, Llerena JC, Jr., Fernandes O. Polymorphic markers suggest a gene flow of CFTR gene from Sub-Saharan/Arabian and Mediterranean to Brazilian Population. The Journal of heredity. 2006 Jul-Aug;97(4):313-7.

134. Larcombe L, Rempel JD, Dembinski I, Tinckam K, Rigatto C, Nickerson P. Differential cytokine genotype frequencies among Canadian Aboriginal and Caucasian populations. Genes and immunity. 2005 Mar;6(2):140-4.

135. Kuffner T, Whitworth W, Jairam M, McNicholl J. HLA class II and TNF genes in African Americans from the Southeastern United States: regional differences in allele frequencies. Human immunology. 2003 Jun;64(6):639-47.

136. Abe-Sandes K, Silva WA, Jr., Zago MA. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. Hum Biol. 2004 Feb;76(1):77-86.

137. Rezende R. AS NOSSAS "ÁFRICAS": UM ESTUDO COMPARATIVO SOBRE A COMPOSIÇÃO ÉTNICA DOS ESCRAVOS NAS MINAS GERAIS DOS SÉCULOS XVIII E XIX. 2004; Available from: http://www.ichs.ufop.br/memorial/trab/h7_2.doc.

138. de Souza Goes AC, de Carvalho EF, Gomes I, da Silva DA, Gil EH, Amorim A, et al. Population and mutation analysis of 17 Y-STR loci from Rio de Janeiro (Brazil). International journal of legal medicine. 2005 Mar;119(2):70-6.

139. Coura RS. CYP1A1 and CYP2E1 polymorphism frequencies in a large Brazilian population. Genetics and Molecular Biology. 2007;30(1):1-5.

140. Ribeiro L, editor. Status, cor e desigualdades sócio-espaciais na metrópole do Rio de Janeiro. XII Encontro da Associação Nacional de pós graduação e pesquisa em planejamento urbano e regional; 2007; Belem; PA; Brasil.

141. Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME, et al. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. Immunogenetics. 2003 Mar;54(12):896-9.

142. Uboldi de Capei MU, Dametto E, Fasano ME, Rendine S, Curtoni ES. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. Eur J Immunogenet. 2003 Feb;30(1):5-10.

143. Javor J, Bucova M, Ferencik S, Grosse-Wilde H, Buc M. Single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in the healthy Slovak population. International journal of immunogenetics. 2007 Aug;34(4):273-80.

144. Delaney NL, Esquenazi V, Lucas DP, Zachary AA, Leffell MS. TNF-alpha, TGF-beta, IL-10, IL-6, and INF-gamma alleles among African Americans and Cuban Americans. Report of the ASHI Minority Workshops: Part IV. Human immunology. 2004 Dec;65(12):1413-9.

145. Meenagh A, Williams F, Ross OA, Patterson C, Gorodezky C, Hammond M, et al. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. Human immunology. 2002 Nov;63(11):1055-61.

146. Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Choi HB, Hong YS, Kim DW, et al. Polymorphisms of IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN-gamma genes in the Korean population. Human immunology. 2003 Oct;64(10):979-89.

147. Hassan MI, Aschner Y, Manning CH, Xu J, Aschner JL. Racial differences in selected cytokine allelic and genotypic frequencies among healthy, pregnant women in North Carolina. Cytokine. 2003 Jan 7;21(1):10-6.

148. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. Transplantation. 2001 Oct 27;72(8):1444-50.

149. Kurzawski M, Pawlik A, Czerny B, Domanski L, Rozanski J, Drozdzik M. Frequencies of the common promoter polymorphisms in cytokine genes in a Polish population. Int J Immunogenet. 2005 Oct;32(5):285-91.

150. Torkildsen O, Utsi E, Harbo HF, Mellgren SI, Vedeler CA, Myhr KM. Ethnic variations of IL-10 polymorphisms in a Sami and Norwegian population. Scand J Immunol. 2005 Jul;62(1):71-4.

151. Bagheri M, Abdi-Rad I, Omrani D, Khalkhali HR. Cytokine typing: SNP allele frequencies in the Iranian population. Int J Immunogenet. 2006 Jun;33(3):193-5.

152. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. Transpl Immunol. 1998 Sep;6(3):193-7.

APENDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação

Av. Marechal Rondon, 381 – São Francisco Xavier (Policlínica Piquet Carneiro)
Tel: 2587-8164

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações ao Voluntário Saudável

- Título do Estudo: **Associação do Polimorfismo Genético de Citocinas e Fibrose Hepática na Infecção por HCV**

- Você não é obrigado a participar deste estudo. Você pode recusar a participar dele ou deixá-lo a qualquer momento.
- O médico/pesquisador estará a sua disposição para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir a respeito do estudo (tel: 2587 8168 – Gustavo)
- As informações pessoais obtidas a seu respeito durante o estudo permanecerão **confidenciais**.
- Se você decidir participar, será necessário um consentimento por escrito.

Explicação do estudo

A Hepatite C Crônica é uma doença que afeta o fígado de pessoas infectadas pelo vírus da Hepatite C (HCV). Este vírus foi descoberto em 1989, mas até hoje não foram esclarecidos completamente os mecanismos que levam o HCV a desencadear a hepatite C. Recentes estudos têm demonstrado que as características genéticas das pessoas que se infectam com este vírus podem influenciar na cura ou na possibilidade da doença se reproduzir mais rapidamente. Essas características genéticas são relacionadas ao DNA que cada pessoa possui em particular, e entre as principais características estão os polimorfismos genéticos de citocinas. Por isso, se fazem necessárias a detecção da expressão gênica dessas citocinas para tentarmos entender como as pessoas reagem à infecção pelo HCV. Além disso, a detecção dos polimorfismos das citocinas se faz necessária em pessoas saudáveis a fim de que se possa determinar a influência do perfil genético na aquisição, duração e controle espontâneo da infecção pelo HCV.

Objetivos

O objetivo deste estudo é analisar as características genéticas de cada paciente infectado pelo vírus da Hepatite C que apresentem fibrose e inflamação hepática. Para isso, serão realizadas as análises de polimorfismos de várias citocinas em pacientes infectados pelo HCV e em voluntários saudáveis.

Procedimentos

Será realizada coleta de sangue que ficará armazenado para a detecção do polimorfismo. Essa coleta será realizada concomitantemente à coleta de rotina para os exames de diagnóstico para o HCV. Para os voluntários saudáveis, a coleta será realizada no momento da doação de sangue realizada no Banco de Sangue Hebert de Souza (UERJ). São necessários apenas 8mL de sangue para que se faça a tipificação dos polimorfismos de citocinas.

Riscos

Durante os procedimentos de coleta de sangue, poderá ocorrer uma mancha roxa (hematoma) no local da punção da veia para a retirada do sangue, conforme descrito no termo de consentimento para doação de sangue.

Possíveis Benefícios

Você poderá não se beneficiar por participar deste estudo, mas você estará ajudando os pesquisadores a compreender melhor esta doença. Desta maneira, futuramente poderá ser possível um tratamento imunoterapêutico que previnam a persistência e a patogênese do HCV através do bloqueio de alguma citocina.

Consentimento Final do Voluntário

Título do Estudo: **Associação do polimorfismo Genético de Citocinas e Fibrose Hepática na Infecção por HCV**

1. Li o documento de Consentimento Livre e Esclarecido para este estudo. Recebi as informações necessárias sobre a proposta do procedimento. Minhas dúvidas foram devidamente esclarecidas.
2. Concordo em participar deste estudo de forma totalmente voluntária.
3. Por ser voluntário, posso me retirar do estudo a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios aos quais tenha direito.
4. Concordo que os resultados do estudo sejam comunicados à comunidade científica na forma de publicações em revistas médicas especializadas, mantendo em sigilo absoluto o meu nome e meu endereço.
5. Autorizo comitês de ética, autoridades regulatórias locais ou estrangeiras a examinarem, se assim o desejarem, estes registros médicos para confirmação das informações coletadas.

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Eu confirmo ter pessoalmente explicado para o paciente acima identificado a natureza e o propósito do estudo.

Pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Testemunha: _____

Assinatura: _____ Data: _____

APÊNDICE B - Questionário para o Membros do Estudo

QUESTIONÁRIO PARA OS MEMBROS DO ESTUDO

1. IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Endereço: _____

Bairro_____ CEP: _____ Telefone: _____

Data de Nascimento: _____/_____/_____ Sexo: _____ Naturalidade: _____

Escolaridade: _____ Profissão: _____

Observações: _____

_____

2. INFORMAÇÕES DE SAÚDE:

Você Bebe? [ ] não ([ ] nunca [ ] parei há _____)[ ] sim _____ doses/dia

Você fuma? [ ] não ([ ] nunca [ ] parei há _____)[ ] sim _____ cigarros/dia

Existem casos, na sua família, de alguma das doenças abaixo? Caso afirmativo, relacione ao lado o grau de parentesco do portador da mesma e o tempo de evolução:

DOENÇA	PARENTESCO	EVOLUÇÃO
Diabetes tipo ___		
Lúpus _____		
Artrite reumatóide		
Hipertensão		
Doença pulmonar _____		
Doença dermatológica ____		

3. INFORMAÇÕES SOBRE ORIGEM ÉTNICA

Para uso do Pesquisador: Grupo Étnico: [ ]branco [ ] negro [ ] indígena [ ] oriental [ ] mestiço

Em que grupo étnico você se classifica?

[ ] branco [ ] negro [ ] indígena [ ] oriental [ ] mestiço

Quanto aos seus pais, eles são:

Pai: [ ] branco [ ] negro [ ] indígena [ ] oriental [ ] mestiço

Nacionalidade: _____

Mãe: [ ] branco [ ] negro [ ] indígena [ ] oriental [ ] mestiço Nacionalidade: _____

Quanto aos seus avós, eles são:

Avô Materno: [ ] branco [ ] negro [ ] indígena [ ] oriental [ ] mestiço

Nacionalidade: _____

Avó Materna: [ ] branco [ ] negro [ ] indígena [ ] oriental [ ] mestiço

Nacionalidade: _____

Avô Paterno: [ ] branco [ ] negro [ ] indígena [ ] oriental [ ] mestiço

Nacionalidade: _____

Avó Paterna: [ ] branco [ ] negro [ ] indígena [ ] oriental [ ] mestiço

Nacionalidade: _____

Observações do entrevistador: _____

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

_____	_____
ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO	NOME COMPLETO
_____	_____
ASSINATURA DO ENTREVISTADOR	NOME COMPLETO

ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESOUISA

Rio de Janeiro, 12 de março de 2008

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Aut. Gustavo Milson Fabricio da Silva
Orient. Prof. Luis Cristovão de M. S. Porto

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1971-CEP/HUPE) " EFEITO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE CITOCINAS EM PACIENTES COM HEPATITE CRÔNICA POR HCV " aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUPE/UERJ

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO B – Ficha de Interpretação

WORKSHEET

Cytokine Genotyping Tray, Lot 4

Cat. # CYTGEN

Name

☐ Patient ☐ Male
☐ Donor ☐ Female

Sample I.D.

Race

Birthdate

ABO/Rh

Disease

Relationship to Patient

TNF-α Results G/G

TGF-β1 Results T/T G/G

IL-10 Results ACC/ATA

IL-6 Results G/G

IFN-γ Results T/T

Tray Exp. Date

Tray Dot #

D-mix Lot #/Batch #

POSITIONS		1H/3H/ 5H/7H/ 9H/11H	1G/3G/ 5G/7G/ 9G/11G	1F/3F/ 5F/7F/ 9F/11F	1E/3E/ 5E/7E/ 9E/11E	1D/3D/ 5D/7D/ 9D/11D	1C/3C/ 5C/7C/ 9C/11C	1B/3B/ 5B/7B/ 9B/11B	1A/3A/ 5A/7A/ 9A/11A	2H/4H/ 6H/8H/ 10H/12H	2G/4G/ 6G/8G/ 10G/12G	2F/4F/ 6F/8F/ 10F/12F	2E/4E/ 6E/8E/ 10E/12E	2D/4D/ 6D/8D/ 10D/12D	2C/4C/ 6C/8C/ 10C/12C	2B/4B/ 6B/8B/ 10B/12B	2A/4A/ 6A/8A/ 10A/12A
RESULTS (mark positive locations)		0	1	8	8	1	1	8	8	1	8	8	8	1	8	8	1
PRODUCT SIZE (bp)		750	125	125	175	175	125	125	300	300	300	250	250	175	175	250	250
SPECIFICITY		Neg Ctrl	TNF-α promoter -308A	TNF-α promoter -308G	TGF-β1 codon 10T	TGF-β1 codon 10C	TGF-β1 codon 25C	TGF-β1 codon 25G	IL-10 promoter -1082A,-819T	IL-10 promoter -1082G,-819C	IL-10 promoter -1082A,-819C	IL-10 promoter -819T,-592A	IL-10 promoter -819C,-592C	IL-6 promoter -174C	IL-6 promoter -174G	IFN-γ intron 1 +874T	IFN-γ intron 1 +874A
TNF-α	G/G (low)																
	G/A (high)																
	A/A(high)																
TGF-β1	T/T G/G (high)																
	T/C G/G (high)																
	T/C G/C (intermediate)																
	C/C G/G (intermediate)																
	T/T G/C (intermediate)																
	C/C G/C (low)																
	C/C C/C (low)																
	T/T C/C (low)																
	T/C C/C (low)																
IL-10	GCC/GCC (high)																
	GCC/ACC (intermediate)																
	GCC/ATA (intermediate)																
	ACC/ACC (low)																
	ACC/ATA (low)																
	ATA/ATA (low)																
IL-6	G/G (high)																
	G/C (high)																
	C/C (low)																
IFN-γ	T/T (high)																
	T/A (intermediate)																
	A/A (low)																

Test Performed by — Date

Read by — Date

Reviewed by — Date