

**FREQÜÊNCIAS DE VARIANTES ALÉLICAS DE  
GENES LIGADOS AO SISTEMA IMUNOLÓGICO  
EM UMA POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS NORMAIS  
DE ORIGEM JAPONESA NO RIO GRANDE DO  
SUL**

**Maísa Michels**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da UFRGS para obtenção do título de  
Mestre em Genética e Biologia Molecular**

**Orientador: Dr. José Artur Bogo Chies**

**Porto Alegre 2003**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor José Artur Bogo Chies, por ter sido meu orientador e pelas muitas lições que aprendi nestes 3 anos de convivência.

À Professora Doutora Nance Beyer Nardi, pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Imunogenética.

Ao Laboratório de Geriatria e Gerontologia da PUCRS, pela disponibilização do material do seu banco de DNA.

A Professora Ivana B.M. da Cruz, da PUCRS, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho e pela obtenção das informações sobre a amostra populacional estudada.

À Professora Sídia, pelas dicas e disponibilidade de auxílio para as análises estatísticas.

Ao Igor e à Aline, por terem me ensinado a trabalhar no laboratório de biologia molecular, pelos dados cedidos referentes a outras populações, utilizados nas comparações, pela amizade, pelo apoio e pelo companheirismo. Muito obrigada, aos dois.

Ao Andrés, por ter me ajudado com as fotografias dos géis de eletroforese.

Ao secretário Elmo e à Ellem, pela cordialidade, simpatia e, sobretudo, grande consideração com que tratam, não só a mim, mas a todos que passam pelo Programa de Pós-graduação de Genética e Biologia Molecular.

À todos os colegas do Laboratório de Imunogenética.

À Luciana, pela utilização da sua impressora.

À Margia e Amanda, pelo apoio, carinho, torcida, amizade, enfim, por tudo. Nunca esquecerei o tempo em que fomos, praticamente, uma família.

Ao meu querido irmão Leandro, pelo apoio e palavras acertadas em momentos de desânimo, pelo incentivo a seguir a carreira acadêmica.

Aos meus pais, Ivo e Olinda, que sempre me incentivaram e me deram condições de estudar, pelo apoio em todas as horas, pelo carinho, pelo amor, por tudo.

Ao Mauricio, meu amor, que me deu força todo o tempo, que me ajudou de todas as maneiras que pode e que jamais cansou de me incentivar. Meu coração é teu.

Aos meus pais, meu irmão e Maurício,  
as pessoas que mais amo neste  
mundo.

# SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de tabelas.....</b>	<b>vii</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Receptor de Célula T.....	9
1.2 Receptor de $\beta$ -quimiocinas CCR5.....	19
1.3 Receptor II do Fator de Necrose Tumoral.....	23
1.4 Interleucina 10.....	25
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>30</b>
3.1 Amostras de DNA.....	30
3.2 Análise molecular do DNA.....	30
3.3 PCR-RFLP do segmento gênico TCRBV3S1.....	31
3.4 PCR-RFLP do segmento gênico TCRBV18.....	33
3.5 PCR-RFLP do segmento gênico TCRBV13S5.....	35
3.6 Análise por PCR do gene CCR5.....	37
3.7 PCR-RFLP do éxon 6 do gene do TNFR-II.....	39
3.8 PCR-RFLP da região promotora gene da IL-10.....	41

<b>4. Resultados.....</b>	<b>43</b>
4.1 Polimorfismos dos segmentos gênicos do receptor de célula T.....	43
4.2 Polimorfismo $\Delta 32$ do CCR5 .....	51
4.3 Polimorfismo do éxon 6 do gene do TNFR-II.....	51
4.4 Polimorfismo da região promotora do gene da IL-10.....	57
4.5 Análises Intra-populacionais.....	58
<b>5. Discussão.....</b>	<b>61</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>73</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>75</b>
<b>8. Bibliografia.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

### A

APC: Célula apresentadora de antígenos

AR: Artrite Reumatóide

### C

CCR5: Receptor 5 de quimiocinas da família CC

CD: Moléculas de superfície celular com funções diversas, utilizadas como marcadores de tipos celulares

CDR: Região determinante de complementaridade

### D

$\Delta 32$ : Deleção de 32 pares de base

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: conjunto de desoxi-fosfo-ribonucleotídeos, no caso os quatro necessários para a síntese de DNA

### F

FR: Região flanqueadora

### G

GAD: Ácido glutâmico descarboxilase

### H

HLA: Antígeno leucocitário humano

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

### I

IL: Interleucina

INF $\gamma$ : Interferon gama

## **K**

kb: Quilobase

## **M**

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MgCl<sup>2</sup>: Cloreto de magnésio

μL: Microlitro

## **P**

pb: pares de base

## **Q**

qsp: quantidade suficiente para

## **R**

RAG: Gene ativador de recombinação

RSS: Região sinal de recombinação

## **S**

SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SLE: Lupus Eritematoso Sistêmico

## **T**

TCR: Receptor de célula T

TCRBV: Segmento gênico da região variável da cadeia beta do TCR

Th: Linfócito T auxiliar

TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

TNF $\beta$ : Fator de necrose tumoral beta

TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral

## **V**

V $\beta$ : Segmento variável da cadeia beta de TCR



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	
Resposta Imune Th1 e Th2.....	3
<b>Figura 2</b>	
Mapa do Japão.....	8
<b>Figura 3</b>	
TCR com cadeias $\alpha$ e $\beta$ e domínios constantes e variáveis.....	10
<b>Figura 4</b>	
Rearranjo dos segmentos gênicos de TCR .....	12
<b>Figura 5</b>	
Mecanismo de ação das enzimas RAG.....	13
<b>Figura 6</b>	
Localização das regiões CDR no TCR.....	14
<b>Figura 7</b>	
Esquema simplificado RFLP para análise genotípica do TCRBV3S1 .....	32
<b>Figura 8</b>	
Foto do gel de agarose do sistema TCRBV3S1 .....	32
<b>Figura 9</b>	
Esquema simplificado RFLP para análise genotípica do TCRBV18 .....	34
<b>Figura 10</b>	
Foto do gel de agarose do sistema TCRBV18 .....	34
<b>Figura 11</b>	
Esquema simplificado RFLP para análise genotípica do TCRBV13S5 .....	36
<b>Figura 12</b>	
Foto do gel de agarose do sistema TCRBV13S5 .....	36
<b>Figura 13</b>	
Foto do gel de agarose do sistema CCR5 .....	37
<b>Figura 14</b>	
Esquema simplificado PCR para análise genotípica do sistema CCR5.....	38
<b>Figura 15</b>	
Esquema simplificado RFLP para análise genotípica do sistema TNFR-II ...	40
<b>Figura 16</b>	
Foto do gel de agarose do sistema TNFR-II .....	40
<b>Figura 17</b>	
Esquema simplificado RFLP para análise genotípica do sistema IL-10.....	42
<b>Figura 18</b>	
Foto do gel de agarose do sistema IL-10 .....	42

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	
Genótipos individuais para os segmentos TCRBV3S1, TCRBV18 e TCRBV13S5.....	44
<b>Tabela 2</b>	
Freqüências alélicas e genótípicas do sistema TCRBV3S1.....	48
<b>Tabela 3</b>	
Freqüências do sistema TCRBV3S1 em diferentes populações.....	48
<b>Tabela 4</b>	
Freqüências alélicas e genótípicas do sistema TCRBV13S5.....	49
<b>Tabela 5</b>	
Freqüências do sistema TCRBV13S5 em diferentes populações.....	49
<b>Tabela 6</b>	
Freqüências alélicas e genótípicas do sistema TCRBV18.....	50
<b>Tabela 7</b>	
Freqüências do sistema TCRBV18 em diferentes populações.....	50
<b>Tabela 8</b>	
Genótipos para os sistemas TNFR-II e IL-10, sexo e local de nascimento de cada indivíduo.....	52
<b>Tabela 9</b>	
Freqüências alélicas e genótípicas do sistema TNFR-II.....	56
<b>Tabela 10</b>	
Freqüências do sistema TNFR-II em diferentes populações.....	56
<b>Tabela 11</b>	
Freqüências alélicas e genótípicas do sistema IL-10.....	57
<b>Tabela 12</b>	
Análise intrapopulacional do sistema TCRBV3S1.....	59
<b>Tabela 13</b>	
Análise intrapopulacional do sistema TCRBV18.....	59
<b>Tabela 14</b>	
Análise intrapopulacional do sistema IL-10.....	60

## RESUMO

As freqüências de variantes alélicas de diferentes genes envolvidos no desenvolvimento da resposta imune foram analisadas em uma população de origem japonesa do sul do Brasil (n=119). Polimorfismos bialélicos dos genes CCR5, TNFR-II e IL-10, e dos segmentos gênicos TCRBV3S1, TCRBV13S5 e TCRBV18 foram analisados por PCR-RFLP. As freqüências alélicas foram determinadas e comparadas com as freqüências encontradas em outros grupos étnicos (caucasóides e afro-brasileiros). Nós observamos a ausência do alelo CCR5 $\Delta$ 32 na população testada. Os polimorfismos dos segmentos gênicos TCRBV3S1 e TCRBV13S5, e do gene IL-10 apresentaram freqüências alélicas significativamente diferentes das freqüências observadas em caucasóides e afro-brasileiros. O polimorfismo do segmento gênico TCRBV18 apresentou freqüências alélicas estatisticamente diferentes de caucasóides. Além disso, a comparação de duas sub-populações (definidas em nossa amostra de acordo com a origem geográfica no Japão) indicou diferenças entre as freqüências alélicas dos polimorfismos gênicos de TCRBV18 e IL-10 das mesmas. Esses dados indicam a existência de diferentes padrões imunogenéticos entre diferentes grupos étnicos. Outros polimorfismos SNPs de genes ligados ao sistema imune serão testados e comparados em nosso laboratório, utilizando as mesmas populações.

# 1. INTRODUÇÃO

Ao longo da escala onto e filogenética, observa-se que os diferentes organismos possuem mecanismos próprios para protegê-los de agentes infecciosos, isto é, para mantê-los imunes às infecções. Quanto mais complexo o animal, mais especializado é o seu sistema imunológico. Humanos e mamíferos em geral, possuem um sistema imune bem desenvolvido. Este sistema de defesa tem como funções reconhecer tudo o que for “estranho” ao organismo, combatendo os agentes infecciosos (minimizando o dano que eles podem causar ao organismo), bem como reconhecendo e atacando células tumorais ou de tecido enxertados. Entre os mais importantes componentes do sistema imune estão os linfócitos B e T, células apresentadoras de antígenos (APC – *antigen-presenting cell*) e mediadores bioquímicos, que ajudam na comunicação e transmissão de sinais entre as células (Lanani *et al*, 1997).

O sistema imune preconiza a destruição e eliminação de organismos invasores e de qualquer molécula tóxica produzida pelos mesmos. No entanto, os mecanismos capazes de defender o organismo de infecções podem causar alguns danos aos tecidos ou mesmo doenças, em algumas situações. O potencial “auto-destrutivo” da resposta imune deve ser contido com uma rigorosa regulação da sua atividade, sendo para isso essencial a capacidade de distinguir o próprio do não-próprio (Abbas *et al*, 2000). Situações onde há falha nesta capacidade de reconhecimento podem ocasionar uma resposta imune agressiva contra células ou tecidos do próprio organismo, processo este chamado de autoimunidade.

Os linfócitos T (ou células T) desempenham um papel central no desencadeamento da resposta imune adaptativa. O TCR (*T cell receptor*) é o receptor antigênico do linfócito T, que através da ligação específica com o

complexo antígeno-MHC (*major histocompatibility complex*) é um dos pontos mais importantes da regulação da resposta imune. A ativação das células T é rigorosamente regulada e envolve a integração coordenada de diferentes sinais para garantir que a diferenciação e expansão clonal sejam adequadas e específicas ao antígeno. Apesar do TCR exercer um papel fundamental na definição da especificidade fina da resposta imune, diversos mecanismos adicionais estão envolvidos na manutenção da auto-tolerância (Chen *et al*, 2000; Kim e Teh, 2001). O requerimento geral de sinais co-estimulatórios para ativação ótima das células T (em adição ao sinal antígeno-específico) é um dos principais mecanismos pelos quais a auto-tolerância é mantida. Os mecanismos de co-estimulação servem para proteger o organismo de reações com proporções inadequadas, ajudando a manter a resposta imune focada ao tecido ou órgão onde ela se faz necessária, bem como servem para diminuir a possibilidade de reações autoimunes. Por outro lado, a falta de ou deficiência na ação dos linfócitos pode ocasionar imunodeficiência (Abbas *et al*, 2000).

De forma geral, pode-se dividir os linfócitos T em duas subclasses funcionais que reconhecem antígenos em diferentes contextos. Os linfócitos T citotóxicos ou CD8+ fazem o reconhecimento de peptídeos apresentados no contexto do MHC classe I, que por sua vez apresenta peptídeos que se originaram no interior da célula (endógenos). Os linfócitos T CD4+, conhecidos também como células T auxiliares ou células T helper (Th), reconhecem os peptídeos complexados ao MHC classe II, que são peptídeos de origem extracelular (exógenos). As células Th ativadas são classicamente divididas em dois tipos:

- Th1 – ativadoras de resposta inflamatória; estimulam respostas mediadas por células efectoras, ativando macrófagos, com produção predominante de citocinas pró-inflamatórias.
- Th2 – ativadoras de resposta humoral; estimulam ativação de células B, com produção de citocinas anti-inflamatórias e mobilização de eosinófilos, mastócitos e basófilos.

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas solúveis responsáveis pela comunicação entre as células do sistema imune. O papel das citocinas no direcionamento e execução de cada um dos tipos de resposta é fundamental. Citocinas como  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$ , IL-2 e  $IFN-\gamma$  são importantes na resposta Th1, tendo características pró-inflamatórias. Já outras, com características anti-inflamatórias, são responsáveis pela evolução da resposta Th2, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Abbas *et al*, 2000). Um esquema sobre as respostas imunes Th1 e Th2 é apresentado na figura 1.

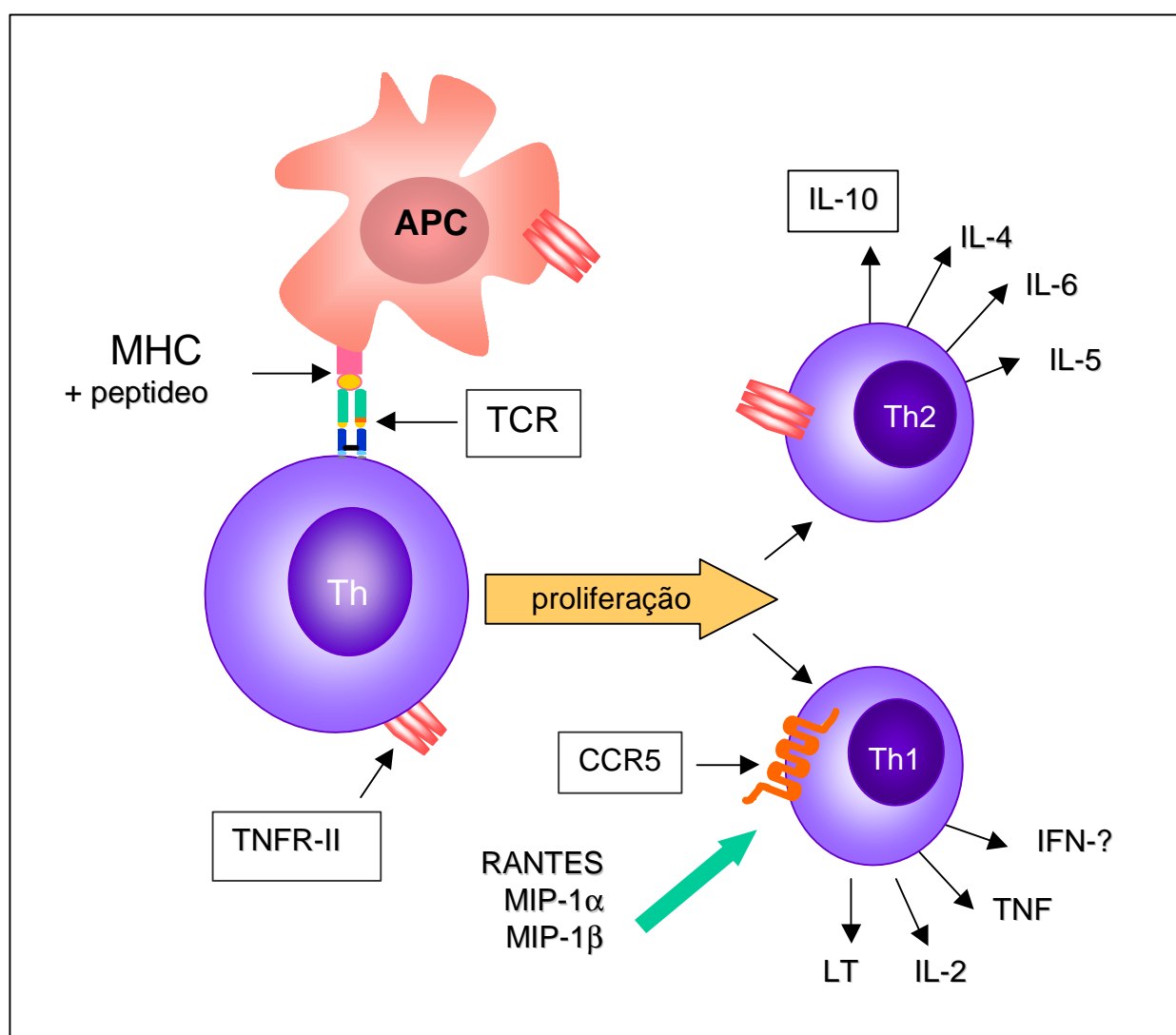


Figura 1.1 – Esquema simplificado, representando a diferenciação e características de células de respostas do tipo Th1 ou Th2, salientando as principais citocinas produzidas.

As citocinas funcionam em uma rede complexa de interações, a qual pode induzir ou reprimir tanto a própria síntese como a síntese de outras citocinas ou receptores celulares. Para agir sobre uma célula alvo a citocina precisa se ligar a um receptor específico na superfície da mesma. Alterações de uma citocina, ou de um receptor de citocina, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, podem ocasionar sérios problemas, tais como imunodeficiências, doenças autoimunes, câncer ou alergias.

Diversos polimorfismos em genes de citocinas já foram descritos e são freqüentemente citados na literatura (Bidwell *et al*, 1999; Blanpain *et al*, 2000; Dean *et al*, 2000; Eskdale *et al*, 1999; Favorova *et al*, 2002; Hahn *et al*, 2001; Herfart *et al*, 2001; Kube *et al*, 2001; Meenag *et al*, 2002; Perry *et al*, 2001; Santee *et al*, 1996; Sargen *et al*, 2000; Wang *et al*, 2001).

O estudo de polimorfismos de genes ligados ao sistema imune humano tem grande importância para a compreensão do funcionamento do mesmo. Algumas das razões para o seu estudo são:

- Reforçar o entendimento da etiologia e patologia de diversas doenças;
- Identificar marcadores de suscetibilidade, severidade ou prognóstico clínico;
- Identificar marcadores para responsividade ou não à terapêutica disponível;
- Identificar novas estratégias para prevenir doenças e desenvolver vacinas mais eficientes.

No contexto de situações patológicas, vários estudos vêm investigando a relação entre polimorfismos de genes ligados ao sistema imunológico e a manifestação de doenças autoimunes e/ou de fundo genético (Favorova *et al*, 2002; Lee *et al*, 2001; Lim *et al*, 1998; Mitchell *et al*, 2000; Nakashima *et al*, 1999; Nishimura *et al*, 2000). Contudo, para o estabelecimento de associação entre uma variante alélica e uma doença, é necessário estabelecer as freqüências de tais variantes polimórficas em populações controle. Como outras características de “background” genético

podem ser relevantes nestes estudos, é importante levar em conta a origem étnica da população.

Poucos estudos vêm sendo feitos no sentido de estabelecer parâmetros imunológicos e imunogenéticos populacionais. O nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Imunogenética da UFRGS) vem trabalhando para suprir esta deficiência. Dresch *et al*, 2002, publicaram um trabalho referente às freqüências de variantes alélicas dos segmentos gênicos TCRBV3S1 e TCRBV18 em populações de indivíduos caucasóides e afro-brasileiros do sul do Brasil. Foi recentemente publicado um trabalho descrevendo as freqüências do alelo CCR5 $\Delta$ 32 do gene CCR5 (um receptor de  $\beta$ - quimiocinas) em populações de indivíduos caucasóides e afro-brasileiros saudáveis e de indivíduos dos mesmos grupos que sofrem de anemia falciforme (Chies e Hutz, 2003). Ainda em nosso laboratório, diferentes análises estão sendo realizadas visando a caracterização imunogenética de populações humanas saudáveis ou acometidas por doenças autoimunes. A caracterização de genes relacionados ao sistema imune em índios Kaingang (Hünemeier *et al*, 2002) e análise das freqüências do alelo CCR5 $\Delta$ 32 em populações indígenas (Neves *et al*, 2002) estão entre os estudos que vem sendo realizados em populações normais de diferentes etnias. Além destes, outros estudos estão sendo realizados na tentativa de associar as freqüências de um determinado alelo com a manifestação de doenças de fundo autoimune. Em indivíduos com artrite reumatóide foram estimadas as freqüências alélicas dos segmentos gênicos TCRBV3S1 e TCRBV18, porém não foi verificada qualquer associação das variantes alélicas com o desenvolvimento da doença (Dresch *et al*, submetido). As freqüências alélicas dos segmentos gênicos TCRBV3S1, TCRBV18 e do gene CCR5 também foram analisadas em pacientes com lupus eritematoso sistêmico, igualmente sem a verificação de associação (Santos *et al*, 2002). As freqüências dos alelos de um polimorfismo do TNFR-II (receptor II do fator de necrose tumoral) foram estimadas em pacientes com lupus eritematoso sistêmico (SLE), mas resultados preliminares não indicam qualquer associação (Mello *et al*, 2002). A análise de polimorfismos da região promotora do gene da



interleucina-10 (IL-10) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (Nornberg *et al*, 2002), assim como o estudo de um polimorfismo do segmento TCRBV13S5 em pacientes com Síndrome de Sjögrens (Nornberg *et al*, 2002), também está em andamento.

Dentro desta linha de pesquisa, caracterizando imunogeneticamente indivíduos normais pertencentes a diferentes grupos populacionais, o presente trabalho mostra a análise das frequências de diferentes variantes alélicas de alguns genes associados ao sistema imune em uma população de origem japonesa radicada no Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

O histórico da colonização japonesa no Sul do Brasil começa com um acordo estabelecido entre os governos Brasileiro e Japonês após a II Guerra Mundial, que previa a vinda de imigrantes japoneses para a região sul brasileira. Aqui, com o auxílio da *Japanese International Cooperation Agency* (JICA) grupos de japoneses foram estabelecidos a partir de 1960 nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, distribuídos em uma área de cerca de 5000 quilômetros. Terras para o assentamento das famílias japonesas foram obtidas pelo governo do Japão e financiadas para as mesmas a preços muito acessíveis. Adicionalmente, os imigrantes receberam subsídios para a sua instalação e acompanhamento, incluindo revisão anual de saúde.

Grande parte desta população de japoneses imigrantes é proveniente da região de Nagasaki e arredores, salientando-se Kumamoto (que fica cerca de 25 km da cidade supracitada), que foi uma região fortemente atingida pela II Guerra Mundial. A província de Hokkaido (extremo norte do Japão) também contribuiu com boa parcela dos imigrantes. Um menor número de indivíduos de diversas outras localidades do Japão também imigrou para o Sul do Brasil. O mapa da Figura 2 localiza todas as cidades onde se originaram indivíduos os quais fazem parte do presente trabalho.

Um dos responsáveis pela revisão anual de saúde é Dr. Yukio Moriguchi, chefe do Instituto de Geriatria e Gerontologia do Hospital São Lucas (PUCRS). O acompanhamento de saúde inclui diversos tipos de exames e análises bioquímicas e hematológicas e, recentemente, um banco de DNA foi estabelecido, fato este que possibilitou a realização de alguns estudos

genéticos destes indivíduos. Este banco de DNA é composto, principalmente, por amostras derivadas dos imigrantes, no entanto, cerca de 10-15% destas amostras foram obtidas de seus descendentes diretos nascidos no Brasil. A partir de colaboração com o Instituto de Geriatria e Gerontologia tivemos a oportunidade de caracterizar imunogeneticamente esta população.

Assim, nosso trabalho se propõe a fazer uma caracterização imunogenética desta população japonesa, tendo sido escolhidos para isso seis sistemas polimórficos de genes ligados ao sistema imune. Escolhemos três sistemas relativos a segmentos gênicos de TCR além de polimorfismos dos genes CCR5, TNFR-II e IL-10. Todos estes são elementos importantes que participam da regulação da resposta imune. A seguir apresentaremos sucintamente cada um destes sistemas polimórficos.

# Japão



Figura 1.2 – Mapa do Japão indicando a localização geográfica das diversas cidades de origem dos imigrantes japoneses pertencentes a população de nosso estudo.

## 1.1 RECEPTOR DE CÉLULA T

A estrutura apresentada pelo TCR é de um heterodímero cujas duas cadeias são ligadas entre si por pontes dissulfídicas. Existem duas formas distintas (porem análogas) de TCR: o TCR  $\alpha\beta$ , composto por uma cadeia  $\alpha$  (TCRA) e uma cadeia  $\beta$  (TCRB); e o TCR  $\gamma\delta$  composto pelas cadeias  $\gamma$  (TCRG) e  $\delta$  (TCRD). Mais de 90% dos linfócitos T do sangue periférico expressam o receptor TCR  $\alpha\beta$ . (Davis e Bjorkman, 1988).

Cada uma das cadeias é composta por uma porção constante e uma porção variável (Figura 3). A porção constante das cadeias fica ligada à membrana da célula, realizando funções sinalizadoras e efetoras, enquanto a porção variável fica totalmente exposta ao meio extracelular, sendo responsável pela ligação com o complexo antígeno-MHC (Abbas *et al*, 2000).

A porção variável do TCR apresenta uma diversidade muito grande para garantir o reconhecimento do maior número possível de antígenos, uma vez que cada estrutura antigênica diferente pode ser reconhecida por apenas uma (ou poucas) molécula(s) de TCR específica(s). O estabelecimento do repertório de especificidades dos receptores TCR depende de diversos mecanismos operando em diferentes pontos do desenvolvimento dos linfócitos T, entre os quais destaca-se a estratégia de rearranjo genético.

Os processos geradores da diversidade dos receptores antigênicos incluem: (Abbas *et al*, 2000):

- Grande número de diferentes segmentos gênicos;
- Recombinação somática destes segmentos gênicos envolvendo participação de enzimas com atividade recombinase;
- Diversidade na junção destes segmentos, com variações devidas à adição ou deleção ao acaso de nucleotídeos nas extremidades dos segmentos rearranjados;
- Associação de cadeias polipeptídicas  $\alpha$  e  $\beta$  ou  $\gamma$  e  $\delta$ .

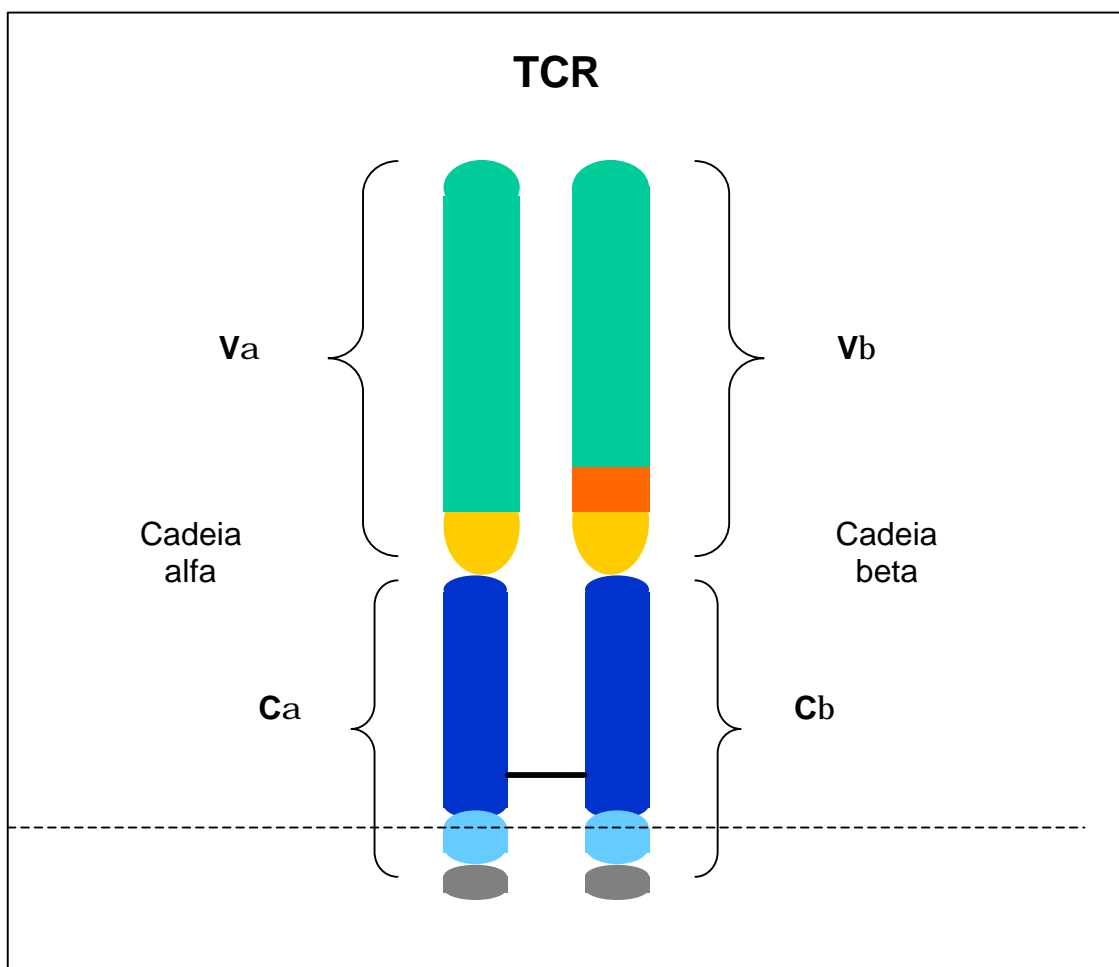


Figura 3 – Desenho esquemático do TCR, com as cadeias *a* e *b* ligadas pela ponte dissulfídica e os respectivos domínios constantes (*C*) e variáveis (*V*). Na cadeia *a* o domínio variável é composto pela recombinação de segmentos gênicos *V* e *J*, enquanto o domínio variável da cadeia *b* é composto por segmentos gênicos dos grupos *V*, *D* e *J*.

O TCR está organizado no genoma humano em grupos de segmentos gênicos. A formação de uma cadeia do TCR depende do rearranjo de diferentes segmentos gênicos denominados V (variabilidade), D (diversidade), J (junção) e C (constante). Os domínios variáveis das cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  são produzidos pela recombinação de segmentos V e J e os domínios variáveis das cadeias  $\beta$  e  $\delta$  são produzidos pela recombinação de segmentos V, D e J (Davis e Bjorkman, 1988; Rowen *et al*, 1996).

A existência de famílias multigênicas V(D)J é uma das primeiras fontes de diversidade do TCR em nível germinal (Tonegawa, 1983). Em princípio, qualquer segmento D pode-se unir a qualquer segmento J, e o conjunto DJ a qualquer segmento V para a formação do RNA (a Figura 4 demonstra esquematicamente como acontece o rearranjo genético para a formação do TCR). Para que o rearranjo possa ocorrer é essencial o reconhecimento de uma seqüência sinal de recombinação (RSS – *recombination signal sequence*), composta de uma seqüência extremamente conservada localizada nas extremidades dos segmentos V, D e J. As RSS são fundamentais para a ocorrência de rearranjo entre estes segmentos, funcionando como pontos de reconhecimento e organização para a maquinaria enzimática. Essas seqüências consistem de um bloco conservado de 7 nucleotídeos (heptâmero) seguido de um espaçador de 12 ou 23 nucleotídeos (os quais apresentam conservação no número de nucleotídeos, mas não em nível de seqüência nucleotídica), seguido por um bloco conservado de 9 nucleotídeos (nonâmero). Entre os principais elementos envolvidos no processo de rearranjo dos segmentos V(D)J podemos citar as enzimas codificadas pelos genes ativadores de recombinação RAG-1 e RAG-2 (Gellert, 2002; Kirch *et al*, 1998). Estas enzimas são capazes de clivar o DNA e unir dois segmentos gênicos de grupos distintos, sendo orientadas pelas RSS (Figura 5).

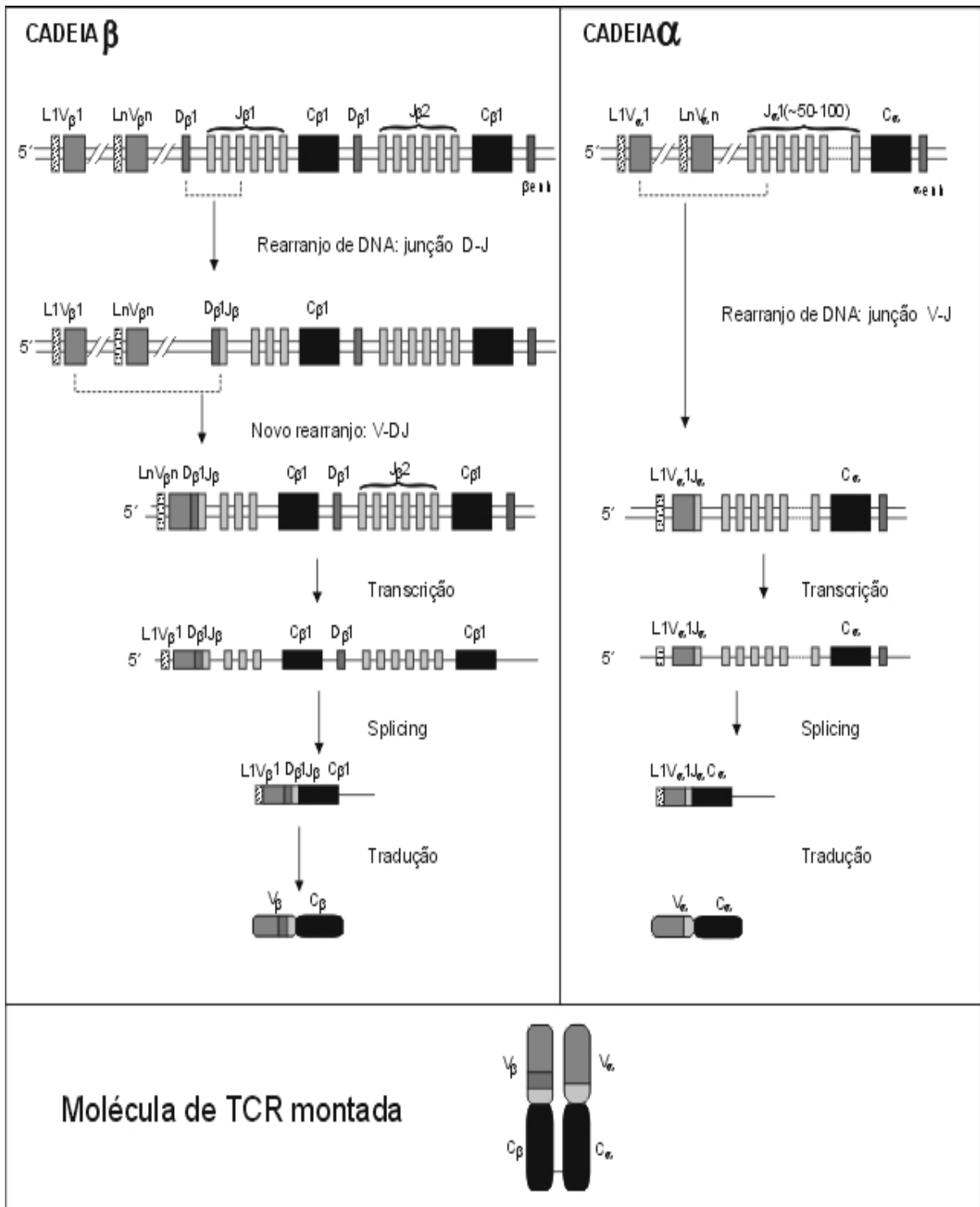


Figura 4 – Desenho esquemático da montagem de um TCR *ab*, partindo do DNA, passando pela recombinação somática das cadeias *a* e *b* até o receptor montado.

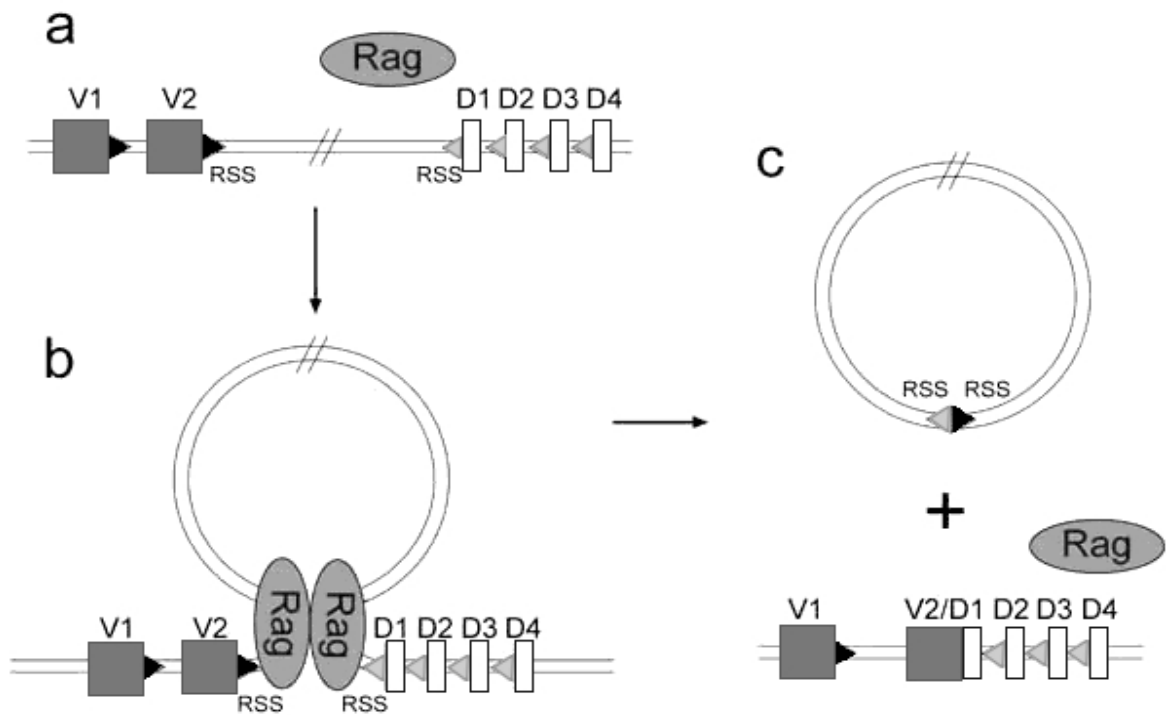


Figura 5 -- Desenho esquemático de uma recombinação somática entre segmentos gênicos de TCR (V-D) quando ocorre o rearranjo "ao acaso" de duas regiões RSS sob ação de RAG.

Os segmentos gênicos V das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR codificam as regiões variáveis do receptor, nas quais estão as regiões hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade CDRs (*complementarity-determining regions*) (Figura 6). Estas regiões são consideradas hipervariáveis por apresentarem maior variabilidade do que as regiões que as separam, chamadas FR (*framework region*). As três CDRs da cadeia  $\alpha$  juntamente com as três da cadeia  $\beta$  são as estruturas responsáveis pela ligação específica com o complexo peptídeo-MHC (Abbas *et al*, 2000; Su e Nei, 2001). As regiões CDR1 e CDR2 das duas cadeias estão envolvidas principalmente no reconhecimento das moléculas do MHC, enquanto as regiões CDR3 estão mais intimamente relacionadas com o reconhecimento do peptídeo apresentado (Chien e Davis, 1993).



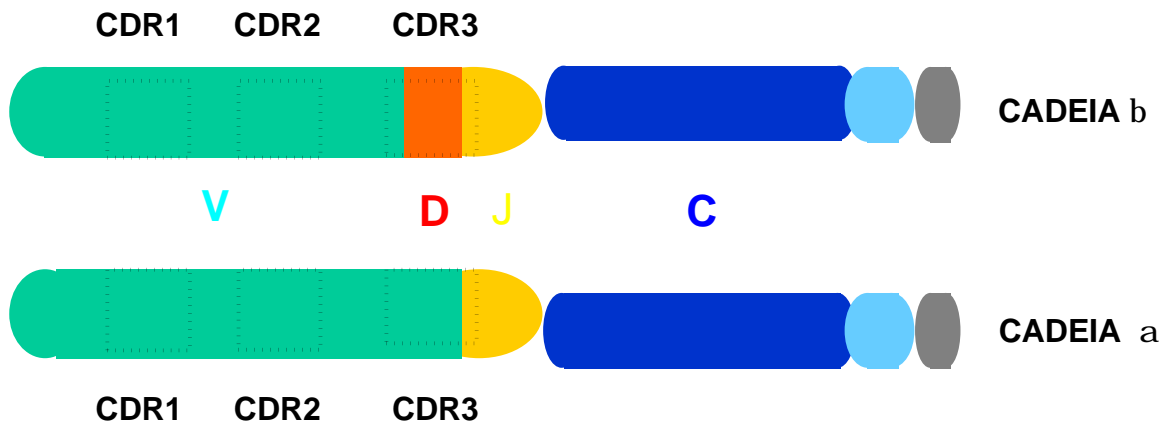


Figura 6 – Distribuição das regiões hipervariáveis nas duas cadeias formadoras do TCR.

A porção  $V\beta$  do TCR é responsável também pelo reconhecimento de superantígenos, que são uma classe especial de proteínas bacterianas e ou virais, capazes de estimular uma resposta imune enérgica. Esta resposta ocorre devido à expansão policlonal de células T, que são ativadas pelo superantígeno através da sua ligação com determinadas regiões da porção  $V\beta$ , chamadas CDR4 por analogia às regiões anteriormente citadas (Luppi *et al*, 1998). Esta característica torna interessante o estudo dos genes TCRBV, pois a resposta adequada a superantígenos é mais um ponto importante no equilíbrio do sistema imune. Uma indução superantigênica leva à deleção das células reativas ocasionando um furo no repertório de especificidades de TCR. Esses furos no repertório de TCR, que em princípio podem parecer desfavoráveis, poderiam ser de alguma forma vantajosos em algumas situações. É o que sugere um estudo feito com uma linhagem de camundongos que possui uma deleção natural de um segmento gênico funcional na região TCRBV, mostrando resistência desses animais ao desenvolvimento de artrite induzida (Osman *et al*, 1999).

Assim, uma vez que o TCR é a chave para o início de uma resposta imune, o delineamento da composição do repertório de TCR de um indivíduo

pode contribuir para a compreensão da patogênese de doenças autoimunes, da resposta imune contra infecções e contra tumores, bem como para a compreensão da manutenção de um sistema imune saudável (Muraro *et al*, 2000).

Em nosso trabalho estudamos alguns segmentos de famílias gênicas V $\beta$  do TCR humano. Os genes da cadeia  $\beta$  de TCR estão localizados no cromossomo 7 em humanos, ocupando uma extensão de cerca de 685 kb. As cópias de segmentos gênicos D e J são poucas, mas existem 65 segmentos gênicos V $\beta$  nesta região. Destes 65 segmentos gênicos, 46 são funcionais enquanto 19 são definidos como pseudogenes (Rowen *et al*, 1996; Su e Nei, 2001; Subrahmanyam *et al*, 2001). Esses pseudogenes são definidos como segmentos gênicos não funcionais que contêm mutações no módulo de leitura ou defeitos na RSS, mas que apresentam homologia significativa com os segmentos gênicos funcionais (Rowen *et al*, 1996). Os 65 segmentos gênicos TCRBV estão agrupados em 30 subfamílias gênicas, que podem conter de 1 a 9 membros (Folch e Lefranc, 2000). A diversidade gerada por este vasto repertório pode ser ainda maior se levarmos em conta a possibilidade de ocorrência de polimorfismos neste conjunto gênico.

Alterações como deleções genômicas no locus TCRBV também ocorrem em humanos e afetam diretamente o número de segmentos gênicos V no genoma. Polimorfismos do tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) em segmentos gênicos do TCR vêm sendo descritos em grande número desde o final da década de 80 (Ball *et al*, 1987; Barron *et al*, 1994; Charmley *et al*, 1990; Charmley *et al*, 1993; Concannon *et al*, 1987; De Inocência *et al*, 1995; Geursen *et al*, 1993; Ibberson *et al*, 1998; Li *et al*, 1990; Perl *et al*, 1989; Posnett, 1990; Posnett *et al*, 1994; Robinson, 1989). Alguns desses resultam em alelos nulos (Barron *et al*, 1994; Charmley *et al*, 1993) e outros resultam em modificações na seqüência de aminoácidos em regiões de provável ligação ao MHC. Polimorfismos em regiões não codificantes também são importantes, pois podem acarretar alterações na eficiência do rearranjo de elementos

gênicos de TCR devido a restrições estruturais para a ação da maquinaria enzimática de recombinação.

Esta última situação é a que acontece com o primeiro segmento gênico alvo do nosso estudo, o TCRBV3S1 (Posnett *et al*, 1994). O TCRBV3S1 apresenta 2 alelos, que diferem apenas em um único nucleotídeo (C/T) dentro da região espaçadora de 23bp (pares de base) da seqüência sinalizadora de recombinação (RSS). Existe uma correlação entre as variantes alélicas do RSS do TCRBV3S1 e a freqüência de células T V $\beta$ 3+ presentes na periferia de um indivíduo. Em indivíduos homocigotos para o alelo 01, as células T periféricas com expressão de V $\beta$ 3 estão em baixa freqüência (menos de 2% do total de células T), enquanto em homocigotos para o alelo 02, o V $\beta$ 3 está presente em um grande número de células T (mais de 6%) (De Inocência *et al*, 1995). O V $\beta$ 3 tem importante papel no reconhecimento de superantígenos (Abbas *et al*, 2000). Além de ser um dos segmentos gênicos que pode ser expresso em maior proporção de células T circulantes, também está entre os segmentos com maior variação individual na freqüência de expressão (Muraro *et al*, 2002). Outra referência interessante sobre o segmento TCRBV3S1 é que a freqüência de seus alelos apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparada às freqüências de populações caucasóides e afro-brasileiras (Dresch *et al*, 2002). Alguns trabalhos investigaram a expressão do segmento V $\beta$ 3 em diferentes situações patológicas. Em células T de infiltrado do músculo cardíaco de indivíduos acometidos por dilatação cardiomiopática idiopática existe alta freqüência de expressão do V $\beta$ 3 (Luppi *et al*, 1998), bem como é alta a expressão do segmento V $\beta$ 3 em linfonodos de camundongos após transplante de medula óssea (Annat e Dutartre, 1998). Também em células T periféricas e de lavado bronco-alveolar de pacientes com asma alérgica, o V $\beta$ 3 é encontrado com maior freqüência média do que nas respectivas células T de indivíduos controle (Wahlstrom *et al*, 2001). Há poucos estudos de correlação dos polimorfismos do TCRBV3S1 com doenças. Um estudo realizado em indivíduos australianos demonstrou associação positiva do alelo 1 do TCRBV3S1 com a manifestação de esclerose múltipla em condições

determinadas (Buhler *et al*, 2000). A associação positiva encontrada neste estudo e os indícios do envolvimento do segmento V $\beta$ 3 com outras situações patológicas, juntamente com as diferenças populacionais já encontradas para as freqüências de seus alelos, são um incentivo para o estudo do polimorfismo do TCRBV3S1 em populações de diferentes origens.

Outro segmento gênico de TCRBV selecionado para o nosso estudo contém um sítio polimórfico bialélico com um alelo nulo. O TCRBV18 é um segmento gênico funcional, codificante da porção V $\beta$ 18 do TCR (Folch e Lefranc, 2000; Rowen *et al*, 1996) classificada por alguns autores como V $\beta$ 20 (Choi *et al*, 1989; Kimura *et al*, 1987). O alelo nulo (alelo 2) do loco TCRBV18 é criado pela alteração de um único nucleotídeo (transição C/T), que introduz um códon de terminação na seqüência, impedindo a adequada tradução do segmento V $\beta$ 18 (Charmley *et al*, 1993). Isto significa que indivíduos homozigotos para tal alelo não são capazes de expressar um TCR V $\beta$ 18+ funcional. O alelo 01 é um alelo funcional e os indivíduos que possuem este alelo apresentam um repertório potencialmente mais diversificado que os homozigotos para o alelo nulo. Estima-se que o V $\beta$ 18 seja expresso em cerca de 3,4% do total de linfócitos T periféricos de um indivíduo, quando este é capaz de produzir o TCR V $\beta$ 18+ funcional (Choi *et al*, 1989). A ausência de células V $\beta$ 18+ em indivíduos homozigotos para o alelo nulo representa a existência de um “furo” no repertório linfocitário. Esta alteração pode ocasionar problemas na montagem de respostas imunes específicas, mas pode participar de resistência ao desenvolvimento de uma dada doença autoimune, como sugerido anteriormente. A expressão do segmento TCRBV18 nos linfócitos T pode também estar relacionada com alergia a pó, relação esta sugerida pelo resultado de um trabalho que mostrou um número de células T circulantes V $\beta$ 18+ bastante elevado em indivíduos alérgicos a pó, em comparação com controles não alérgicos (Kircher *et al*, 2002). Já no caso da esclerose múltipla, o segmento V $\beta$ 18 foi encontrado em uma grande proporção das células T do líquido céfalo-raquidiano de indivíduos afetados, sendo estas células T reativas contra mielina (Heard *et al*, 1999). Outro dado relevante sobre o TCRBV18 é

que as frequências de seus dois alelos também são significativamente diferentes em comparações feitas entre populações caucasóides e afro-brasileiras (Dresch *et al*, 2002).

O terceiro polimorfismo de TCRBV avaliado neste trabalho está no segmento gênico TCRBV13S5, um gene funcional que codifica porções do TCR da família V $\beta$ 13. Os dois alelos do segmento TCRBV13S5 são diferentes entre si pela substituição de um único nucleotídeo que altera um aminoácido na região do segmento envolvida no reconhecimento antigênico. O V $\beta$ 13 está entre os segmentos gênicos de TCR com grande expressão entre células T circulantes (cerca de 4,8%) de indivíduos saudáveis, isto é, livres de infecção (Muraro *et al*, 2002).

A expressão dos segmentos V $\beta$ 13 no TCR de indivíduos em diferentes situações patológicas vem sendo bastante estudada. Um estudo de 1997 mostra a importância do TCRBV13 no reconhecimento de um epítopo específico de pólen em pacientes alérgicos (Breiteneder *et al*, 1997). Outros estudos mostram o envolvimento do V $\beta$ 13 na tireoidite autoimune (Wang *et al*, 2001), cirrose hepática (Mayo *et al*, 1996), em resposta a antígenos parasitários (Sartoro *et al*, 1997) e em transplante renal (Kumagai-Braesc *et al*, 1997). Um trabalho demonstra que o V $\beta$ 13 é frequentemente expresso em células T envolvidas na rejeição à transplantes e mostra que vacinas de DNA anti-V $\beta$ 13 melhoram a sobrevivência de ratos transplantados (Vignes *et al*, 2000). O polimorfismo do segmento gênico TCRBV13S5 ainda não foi associado a nenhuma patologia específica. No entanto, uma variante da região promotora do segmento gênico TCRBV13S5 (TCRBV13S5P\*1) foi associada com o desenvolvimento de artrite reumatóide em indivíduos HLA-DR4+ (Mu *et al*, 1996). Isso sugere que diferenças na expressão do segmento TCRBV13S5, bem como polimorfismos do próprio TCRBV13S5 podem estar correlacionados com a patogênese da artrite reumatóide ou de outras doenças autoimunes.

## 1.2 - RECEPTOR DE $\beta$ -QUIMIOCINAS – CCR5

Quimiocinas são uma classe de citocinas estruturalmente homólogas que estimulam a migração dos leucócitos (Abbas *et al*, 2000). São proteínas pequenas que estão envolvidas no tráfego normal de leucócitos em órgãos linfóides e não-linfóides e no recrutamento de leucócitos para sítios com trauma ou infecção (Nansen *et al*, 2002). As quimiocinas são essenciais para a atração e ativação local de sub-populações de leucócitos através de processos determinados por especificidade de ligação e padrões de expressão de receptores nos leucócitos. As quimiocinas e seus respectivos receptores afetam a migração e ativação de monócitos, eosinófilos e basófilos, bem como de linfócitos T (Herfarth *et al*, 2001). Os efeitos biológicos das quimiocinas são mediados pela sua interação com um grupo de receptores caracterizados por sua constituição com 7 domínios transmembrana. As duas principais famílias de receptores de quimiocinas são denominadas CXCR e CCR, por terem como ligantes quimiocinas das famílias CXC ( $\alpha$ -quimiocinas) e CC ( $\beta$ -quimiocinas), respectivamente. Enquanto os receptores CXCR estão tradicionalmente associados com respostas inflamatórias agudas, os receptores CCR têm maior expressão em tipos celulares relacionados com inflamação crônica e com reação inflamatória mediada por células T (Nansen *et al*, 2002).

O CCR5 (codificado pelo gene de mesmo nome), atua como receptor celular para as quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  (MIP - *macrophage inflammatory protein*). Este receptor é expresso em macrófagos, células dendríticas, células tronco hematopoiéticas, células microgliais e células T (Blanpain *et al*, 2000). A expressão em linfócitos T ocorre preferencialmente nas células do tipo Th1 (Favorova *et al*, 2002; Mitchell *et al*, 2000; Nansen *et al*, 2002; Ransohoff e Karpus, 2001), auxiliando na indução de respostas imunes Th1 e mediando a quimiotaxia destas células para áreas de inflamação.

Além do importante papel fisiológico na inflamação o CCR5 é conhecido por ser um importante co-fator (juntamente com a molécula CD4)

para a entrada do vírus HIV-1 na célula (Dimitrov *et al*, 1998; Smith *et al*, 1998). A ocorrência de uma deleção de 32 pb no gene CCR5 está correlacionada com resistência à infecção por HIV-1 que possui tropismo por macrófagos. O alelo deletado é chamado CCR5 $\Delta$ 32 e quando em homozigose, pode proporcionar resistência quase completa à infecção por HIV-1 que possui tropismo por macrófagos, mesmo sob repetidas exposições. (Blanpain *et al*, 2000; Lucotte *et al*, 2001; Smith *et al*, 1997). Os indivíduos heterozigotos não parecem estar protegidos contra a infecção, mas apresentam um retardamento no desenvolvimento da SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida) propriamente dita, que leva 2 a 4 anos a mais para se manifestar que em indivíduos homozigotos CCR5 funcional. (Smith *et al*, 1997; Lucotte *et al*, 2001).

No alelo CCR5 $\Delta$ 32 a deleção ocorre na região do gene que codifica o segundo domínio transmembrana, causando (a partir desse ponto) uma mudança no módulo de leitura do DNA que resulta em códon de terminação precoce. A terminação precoce ocorre na região da segunda alça extracelular do receptor, levando à tradução de uma proteína truncada em que faltam os últimos três domínios. A proteína constituída desta forma perde totalmente a sua função e não consegue sequer ser expressa na superfície celular (Blanpain *et al*, 2000). Portanto, os indivíduos homozigotos para CCR5 $\Delta$ 32 não expressam o receptor CCR5, enquanto os heterozigotos expressam o receptor em menor quantidade do que homozigotos normais. Apesar desta deficiência, os indivíduos homozigotos para a deleção aparentemente não apresentam alterações do sistema imune, o que levaria a crer em uma redundância genômica para a função do receptor (Stephens *et al*, 1998). No entanto, em camundongos com expressão deficiente do receptor CCR5 constatou-se suscetibilidade aumentada a diversas infecções, como criptococose, toxoplasmose e leishmaniose (Nansen *et al*, 2002). Além disso, camundongos CCR5  $-/-$  têm alto índice de mortalidade quando infectados pelo vírus da influenza (Dawson *et al*, 2000). Assim, o fato de não haver um notório aumento na suscetibilidade a infecções em humanos homozigotos para o alelo

CCR5 $\Delta$ 32, não implica, necessariamente, em redundância completa para função do receptor .

O alelo CCR5 $\Delta$ 32 é encontrado em frequência relativamente alta em algumas populações caucasóides (até 14%) e é ausente em populações Africanas, Asiáticas e Nativas Americanas. Há estimativas de que a mutação CCR5 $\Delta$ 32 tenha surgido na Europa, entre 2000 e 700 anos atrás. O fato da frequência do alelo mutante ser alta em populações caucasóides, apesar de a mutação ser recente, fortalece a hipótese de que eventos seletivos teriam contribuído para a manutenção do alelo na população. Epidemias que ocorreram no início do milênio passado, como a peste negra, por exemplo, estão entre possíveis eventos que teriam selecionado positivamente o alelo CCR5 $\Delta$ 32 (Stephens *et al*, 1998; Nansen *et al*, 2002).

Por ser um gene envolvido em desenvolvimento de resposta imune inflamatória, o CCR5 parece ser bastante importante em doenças que apresentam quadro de inflamação, como é o caso de artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico. Diversos estudos analisaram a influência do alelo CCR5 $\Delta$ 32 sobre a manifestação de doenças genéticas ou de fundo autoimune. Zapico *et al*, 2000, demonstraram que o alelo CCR5 $\Delta$ 32 está correlacionado com manifestações menos agressivas de artrite reumatóide. Estudos sobre asma (Mitchell *et al*, 2000) e doença de Crohn's (Herfarth *et al*, 2001) excluíram a associação do alelo CCR5 $\Delta$ 32 com o desenvolvimento destas patologias. O mesmo alelo foi associado negativamente com o desenvolvimento precoce de esclerose múltipla em pacientes caucasóides (Favorova *et al*, 2002).

Contudo, tão importantes quanto os estudos de correlação com doenças são os estudos realizados com indivíduos normais que utilizam o CCR5 $\Delta$ 32 como marcador para a caracterização de populações. Uma vez que este alelo teve origem em algumas populações da Europa, a sua verificação em população não caucasóide é forte indício de fluxo gênico e miscigenação com indivíduos de origem européia (Blanpain *et al*, 2000; Stephens *et al*, 1998). Sabe-se que a frequência do CCR5 $\Delta$ 32 é maior em povos do norte da Europa



(na Suécia e Islândia a frequência chega a 0,14), do que as frequências observadas no sul do continente. Em Portugal e Grécia as frequências verificadas são de cerca de 0,05 (Lucotte *et al*, 2001). Um estudo anterior já demonstrava uma distribuição da frequência do alelo  $\Delta 32$  na Europa em um sistema de clima norte-sul (Stephens *et al*, 1998). Este trabalho também aponta que as frequências do mesmo alelo em diversas populações da Europa e da Ásia apresentam igualmente um declínio gradual da presença CCR5 $\Delta 32$  no sentido oeste-leste, até não ser mais identificado, como na Geórgia, Índia, China e Coreia. Contudo, um estudo mais recente realizado na China identificou a presença do CCR5 $\Delta 32$ , ainda que em frequências muito baixas (Zhang *et al*, 2002).

A análise das frequências de CCR5 $\Delta 32$  na América é interessante pelo importante componente de colonização europeia e, em alguns países, pela ampla miscigenação racial. No Brasil, há estudos da frequência do alelo  $\Delta 32$  em populações miscigenadas, como doadores de um banco de sangue em São Paulo, onde a frequência registrada foi de 0,032, sendo 88,5% indivíduos homocigotos para o alelo tipo selvagem e 11,5% heterocigotos (Mikawa *et al*, 2002). Um trabalho anterior, realizado por Passos *et al* em 1998, indicava que a frequência do alelo CCR5 $\Delta 32$  em uma população brasileira urbana era de 0,035. Em nosso laboratório, a frequência encontrada para uma população normal do Rio Grande do Sul foi de 0,04 (Chies e Hutz, 2003).

A análise das frequências dos alelos CCR5 selvagem e CCR5 $\Delta 32$  na população originária do Japão deverá confirmar a ausência do alelo com a deleção nesta população ou poderá contribuir para a verificação de possível miscigenação com europeus e/ou seus descendentes.

### 1.3 - RECEPTOR II DO FATOR DE NECROSE TUMORAL

O Fator de Necrose Tumoral, conhecido como TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*  $\alpha$ ) é uma citocina pleiotrópica que apresenta uma variedade de diferentes efeitos biológicos, tais como citotoxicidade (contra alguns tipos de células tumorais), indução de proliferação, possui efeitos antivirais e de indução de expressão gênica. O TNF é uma das principais citocinas pró-inflamatórias e é muito importante na inicialização e regulação da cascata de citocinas durante a resposta inflamatória (Perry *et al*, 2001).

A atividade biológica de TNF- $\alpha$  é mediada por dois tipos de receptores, com distintos domínios citoplasmáticos e com domínios extracelulares similares. São eles: o TNFR-I, também conhecido como p55 ou CD120a, e TNFR-II, também chamado p75 ou CD120b (Bridges *et al*, 2002; Santee e Owen-Schaub, 1996).

TNFR-I e TNFR-II atuam na mediação de citotoxicidade, porém possuem algumas funções distintas um do outro. O TNFR-I sinaliza para o crescimento de fibroblastos, ativação e adesão de células endoteliais e resposta antiviral, enquanto o TNFR-II sinaliza para a proliferação de timócitos e de células T periféricas, secreção de fatores estimuladores de colônia para macrófagos/granulócitos, inibição de hematopoiese primária e inativação da depuração do TNF pelos rins (Yamada *et al*, 1999; Santee e Owen-Schaub, 1996; Tartaglia *et al*, 1993). Os dois receptores de TNF estão presentes em muitos tipos celulares, mas o TNFR-II é predominantemente expresso em células de linhagens hematopoiéticas, particularmente em linfócitos T e B ativados (Bridges *et al*, 2002). O TNFR-II também pode ser encontrado no organismo sob a forma solúvel, agindo como um antagonista do TNF (Al-Lamki *et al*, 2001; Bradley *et al*, 1995).

Estudos indicam a presença de níveis alterados de TNFR-II solúvel em diferentes patologias. Crianças com síndrome nefrótica possuem níveis elevados de TNFR-II plasmático. Cabe salientar que altos níveis de expressão

do receptor no plasma e nas células, simultaneamente, estão associados com resistência ao tratamento com esteróides nestes pacientes pediátricos (Tain *et al*, 2002). Níveis elevados de TNFR-II plasmáticos também são observados em pacientes com deficiência cardíaca crônica (Nowak *et al*, 2002). O TNFR-II solúvel tem sido empregado terapêuticamente como inibidor do TNF- $\alpha$  em doenças como artrite reumatóide e síndromes mielodisplásicas (Maciejewski *et al*, 2002; Tsimberidou *et al*, 2002).

O gene que codifica o TNFR-II fica no cromossomo 1p36, contendo 10 éxons que ocupam uma faixa de 26kb. Um estudo completo sobre a estrutura do gene do TNFR-II mostrou a existência de três polimorfismos do tipo SNP nos éxons 4, 6 e 9, todos os quais resultando em modificação de um aminoácido (Santee e Owen-Schaub, 1996). O mais estudado destes polimorfismos é o da posição 196 do éxon 6, uma transversão T/G que resulta na modificação do aminoácido metionina para arginina. O alelo que possui o nucleotídeo T na posição 196 do éxon 6 codifica uma metionina e é chamado 196M, enquanto o alelo que possui o nucleotídeo G na nesta posição codifica uma arginina e é chamado 196R. Sabe-se que éxon 6 no gene do TNFR-II codifica o domínio transmembrana da molécula e é nessa região que se encontra o sítio de clivagem para a forma solúvel, o que pressupõe uma possível influência dos diferentes alelos deste éxon na liberação do TNFR-II solúvel. Porém, as conseqüências da substituição de aminoácidos que ocorre na posição 196 sobre a atividade do TNFR-II não estão totalmente esclarecidas.

Diversos trabalhos se propuseram a correlacionar polimorfismos do TNFR-II com situações patológicas. Em uma população caucasóide o alelo 196R foi associado com a manifestação de artrite reumatóide familiar, sendo a associação descartada nos demais casos de artrite (Barton *et al*, 2001). Igualmente não há associação entre artrite reumatóide e o alelo 196R em populações afro-americanas e japonesas (Bridges *et al*, 2002). Outras associações positivas foram encontradas entre os diferentes alelos do TNFR-II e doenças. Por exemplo, há associação descrita entre a manifestação de mielopatia e o alelo 196M (Nishimura *et al*, 2000) e de SLE e o alelo 196R em

uma população japonesa (Komata *et al*, 1999). Esta associação é corroborada por outro trabalho realizado com indivíduos japoneses, sugerindo o envolvimento do alelo 196R do TNFR-II na patogênese do SLE (Morita *et al*, 2001). Porém, em um estudo similar realizado em populações européias (Reino Unido e Espanha), não foi confirmada esta associação (Al-Ansari *et al*, 2000). A ausência de associação também foi constatada quando o estudo foi realizado em uma população Coreana (Lee *et al*, 2001).

## 1.4 - INTERLEUCINA 10

A IL-10 (interleucina 10) é uma citocina característica de resposta imune do tipo Th2, possuindo potente ação antiinflamatória e imunoregulatória. Sua ação regulatória pode induzir a diminuição da expressão de moléculas de MHC-I e MHC-II nas APCs e induzir a diminuição da produção de citocinas Th1 (Yee *et al*, 2001; de Waal Malefyt *et al*, 1991). Além disso, a IL-10 parece ser capaz de inibir diretamente a proliferação de células T, independentemente da ação sobre as APCs, e pode também contribuir para a indução de anergia nestas células. Por outro lado, a secreção de IL-10 pode reforçar a atividade imunológica, estimulando a proliferação, ativação e quimiotaxia de células T CD8+ e ativando células NK (*natural killers*), além de estimular a produção de outras citocinas (Lalani *et al*, 1997).

A IL-10 é produzida principalmente por macrófagos ativados, além de linfócitos e, em menor proporção, por algumas células não linfóides, como mastócitos. Como sabemos, os macrófagos estão envolvidos na resposta imune contra microorganismos através da secreção de citocinas e expressão de co-estimuladores que auxiliam a ativação de linfócitos T e resposta imune mediada por células. A IL-10 age sobre macrófagos para interromper a resposta imune e levar o sistema de volta ao estado normal quando a infecção

é erradicada. Portanto, sua ação inibitória sobre a atividade de macrófagos é um perfeito exemplo de regulação negativa por retroalimentação (Abbas *et al*, 2000). A IL-10 tem importante participação na resposta Th2, resposta esta que está envolvida na patogênese de diferentes doenças (como alergias) e exerce um papel importante na evolução mais rápida e persistente de infecções (Nakashima *et al*, 1999).

A IL-10 humana é uma proteína homodimérica de 34 a 40 kDa, apresentando 4 domínios globulares alfa-helicóides. Suas duas cadeias possuem 160 aminoácidos cada uma (cerca de 18,5 kDa) e são unidas por pontes dissulfídicas, essenciais para sua atividade (Lalani *et al*, 1997). O gene da IL-10 contém 4 éxons e está presente em um única cópia no genoma, localizada no cromossomo 1q31-q32. A expressão da IL-10 tem uma regulação rígida, mas ela também é expressa constitutivamente em níveis muito baixos por alguns tipos celulares. Os mecanismos da regulação gênica da IL-10 estão sendo estudados, mas ainda não estão esclarecidos totalmente. Células B imortalizadas, células de linfoma de Burtkin e células infectadas por Epstein-Barr vírus expressam IL-10 constitutivamente em níveis elevados (Kube *et al*, 2001; Lalani *et al*, 1997; Wu *et al*, 2002). Estudos familiares com pares de gêmeos indicam que cerca de 75% da variação na produção de IL-10 é determinada geneticamente, com indícios de que o controle da produção seja feito em nível de transcrição (Lalani *et al*, 1999).

Vários sítios polimórficos já foram descritos dentro da região promotora do gene da IL-10. A região flanqueadora 5' apresenta vários polimorfismos que podem influenciar a expressão da proteína. Dois polimorfismos de microsatélites estão descritos na região promotora do gene e são chamados G (aproximadamente na posição – 1000) e R (aproximadamente na posição – 4000). Entre os diversos SNPs encontrados na mesma região, três foram descritos nas posições – 1087, – 824 e – 597 (Eskdale *et al*, 1999; Kube *et al*, 2001), sendo estes referidos por alguns autores como – 1082, – 819 e – 592 (Yee *et al*, 2001; Meenagh *et al*, 2002). Na posição –1087 podem ser encontrados os nucleotídeos G ou A; na posição – 824 ocorre a transição C/T e na posição – 597 podem estar presentes os nucleotídeos C ou A. Estudos

demonstram que existe um forte desequilíbrio de ligação entre os três loci e há apenas três haplótipos descritos em populações caucasóides: GCC, ACC e ATA (Dean *et al*, 2000). Estes haplótipos foram correlacionados com diferentes níveis de expressão de IL-10. O haplótipo GCC está associado com alta produção da citocina, ATA é associado com baixa produção e ACC está relacionado com níveis intermediários. Desta forma, os indivíduos com níveis de expressão de IL-10 mais elevados seriam os homozigotos GCC/GCC (Chiavetto *et al*, 2002; Koch *et al*, 2001)

Em diversas doenças de fundo autoimune foram encontrados níveis de expressão alterados para a IL-10, quando comparados com indivíduos normais. Pacientes com SLE, Síndrome de Sjogren's, esclerose sistêmica e doença de Kawasaki apresentam níveis séricos de IL-10 aumentados em comparação com indivíduos saudáveis (Lalani *et al*, 1997; Mok *et al* 1998; Nakashima *et al*, 1999). Em outras situações, a diminuição da expressão da IL-10 é que está associada com patologias, como é o caso da asma (Lim *et al*, 1998) e com formas severas de artrite (Hajeer *et al*, 1998). Vários estudos foram realizados no sentido de relacionar os polimorfismos que interferem no grau de expressão da IL-10 com essas doenças, bem como com outras situações patológicas em que essa citocina esteja alterada. Os SNPs da região promotora, – 1087, – 824 e – 597 foram analisados em muitos desses estudos, tanto individualmente como combinados em haplótipos. Jong *et al*, 2002, estudaram polimorfismos dos sítios –824 e –1087 em pacientes com esclerose múltipla, não encontrando associação com a doença. Um outro estudo direcionado para os haplótipos dos sítios –1087, –824 e –597 e asma também não demonstrou diferenças entre doentes e indivíduos controle (Lim *et al*, 1998). Já em um trabalho com indivíduos esquizofrênicos, foram verificadas diferenças entre as frequências do alelo –1087G desses pacientes e de indivíduos normais, sendo este alelo mais freqüente nos esquizofrênicos (Chiavetto *et al*, 2002). Também foi encontrada uma maior freqüência do alelo –1087G em indivíduos lúpicos com comprometimento renal do que no grupo controle (Hurme *et al*, 1998). Outro trabalho interessante demonstrou que a variante alélica –597C está associada

um subgrupo de indivíduos com diabetes tipo I (com alta produção de anticorpos anti-GAD) em uma população japonesa (Tegoshi *et al*, 2002).

O grande número de estudos de associação entre variação nas freqüências alélicas dos polimorfismos da região promotora da IL-10 e doenças estimulou Meenagh *et al*, 2002, a pesquisar diferenças nas freqüências alélicas em diferentes grupos étnicos. Neste trabalho constatou-se importantes diferenças entre populações de indivíduos europeus (irlandeses), africanos (Zulus) e chineses. O alelo -597C é bastante freqüente em europeus e africanos (0,817 e 0,661, respectivamente), enquanto chineses sua freqüência é de apenas 0,327.

Estes dados reforçam, mais uma vez, a importância da caracterização imunogenética de grupos populacionais de diferentes origens, uma vez que o estabelecimento de padrões populacionais e a verificação de diferenças entre diferentes etnias poderão auxiliar nos estudos futuros de associação de variantes gênicas com doenças.

## 2. OBJETIVOS

Com o objetivo geral de caracterizar imunogeneticamente uma população de indivíduos de origem japonesa residentes no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, a proposta do presente trabalho é:

- Determinar as frequências alélicas e genóticas de seis diferentes sistemas polimórficos de genes ligados ao sistema imune nessa população, tendo sido selecionados cinco polimorfismos bialélicos do tipo SNP (nos segmentos gênicos TCRBV3S1, TCRBV13S5, TCRBV18 e nos genes do TNFR-II e da IL-10) e um sistema bialélico envolvendo uma deleção de 32 pb no gene CCR5.
- Comparar os resultados obtidos com dados de outras populações normais de diferentes origens.



## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Amostras de DNA**

As amostras de DNA utilizadas para a realização do nosso estudo foram obtidas junto ao laboratório de Geriatria e Gerontologia da PUCRS, que mantém um banco de DNA de uma população de origem japonesa que reside no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. De um total 634 indivíduos que estão representados no banco de DNA, analisamos 119 amostras, das quais 53 são homens e 66 são mulheres. Apenas 6 destes indivíduos são nascidos no Brasil, sendo descendentes diretos de Japoneses. Os demais 113 indivíduos são naturais do Japão, tendo imigrado para o Brasil de diferentes localidades daquele país, as quais são indicadas no mapa da Figura 2.

### **3.2 Análise Molecular do DNA**

A frequência dos diferentes alelos foi verificada através da genotipagem de cada amostra para cada um dos sistemas polimórficos estudados. Estas genotipagens foram feitas com utilização de técnicas de PCR-RFLP, na qual o segmento gênico a ser estudado é amplificado por PCR com *primers* específicos e posteriormente o produto passa por uma clivagem com endonuclease de restrição. No caso do polimorfismo de deleção do gene CCR5, o passo de digestão pela endonuclease não é necessário. A visualização do resultado é feita sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose com brometo de etídeo. As diferenças entre os alelos são verificadas pela presença ou ausência do sítio de restrição da enzima, o que resulta em diferentes padrões de migração no gel.

### 3.3 PCR-RFLP do segmento gênico TCRBV3S1

A análise do segmento gênico TCRBV3S1 teve início com a amplificação por PCR, a partir das amostras de DNA total, usando-se os *primers* 5'-CCTTGATGGCCTGTTTTTCAC-3' e 5'-GTGCCATCGGAGCCAGCAC-3' (Posnett et al, 1994). As reações foram feitas em um volume total de 25µL, sendo preparadas da seguinte forma:

- \* 1µL de DNA total
- \* 1µL de *primers* (10pmol/µL cada)
- \* 1µL de dNTP (10 mM cada nucleotídeo)
- \* 1µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- \* 2,5µL de tampão 10X
- \* 0,2µL de Taq DNA polimerase 5U/µL
- \* qsp H<sub>2</sub>O

As reações foram submetidas a 36 ciclos de 1 minuto para desnaturação (94°C), 1 minuto para anelamento (56°C) e 1 minuto e 30 segundos para extensão (72°C). Os ciclos foram antecidos por 1 minuto a 94°C e sucedidos por 3 minutos a 72°C. O fragmento assim amplificado possui 431 pb. Este produto foi então submetido à digestão pela enzima *PvuII*, incubando-se 10µL do produto de PCR e mais 10U da enzima por 3 horas a 37°C. Após esta etapa o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (Figura 8). As duas variantes alélicas do segmento Vβ3.1 diferem em um único nucleotídeo (C/T). O alelo que possui a citosina não é clivado pela enzima *PvuII*. No outro alelo, a presença da timina cria um sítio de restrição para enzima, que então cliva o segmento em dois fragmentos, sendo um de 352 pb e outro de 79 pb (que por ter peso molecular pequeno em relação aos outros segmentos pode ser de difícil visualização no gel de agarose 1%). Um esquema simplificado desta reação é apresentado na Figura 7. Portanto, amostras de homozigotos para o alelo 1 (C), apresentam, após a clivagem, apenas a banda original de 431 pb, enquanto as amostras de homozigotos para o alelo 2 (T) apresentam banda de 352 pb. Os

casos de indivíduos heterozigotos são identificados pela presença das bandas de 431 pb e 352 pb simultaneamente.

FIGURA 7 – Esquema simplificado do ensaio RFLP realizado para análise genotípica do segmento gênico TCRBV3S1.

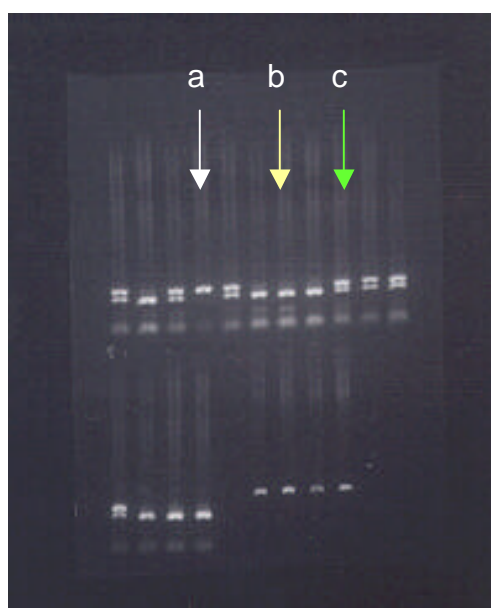
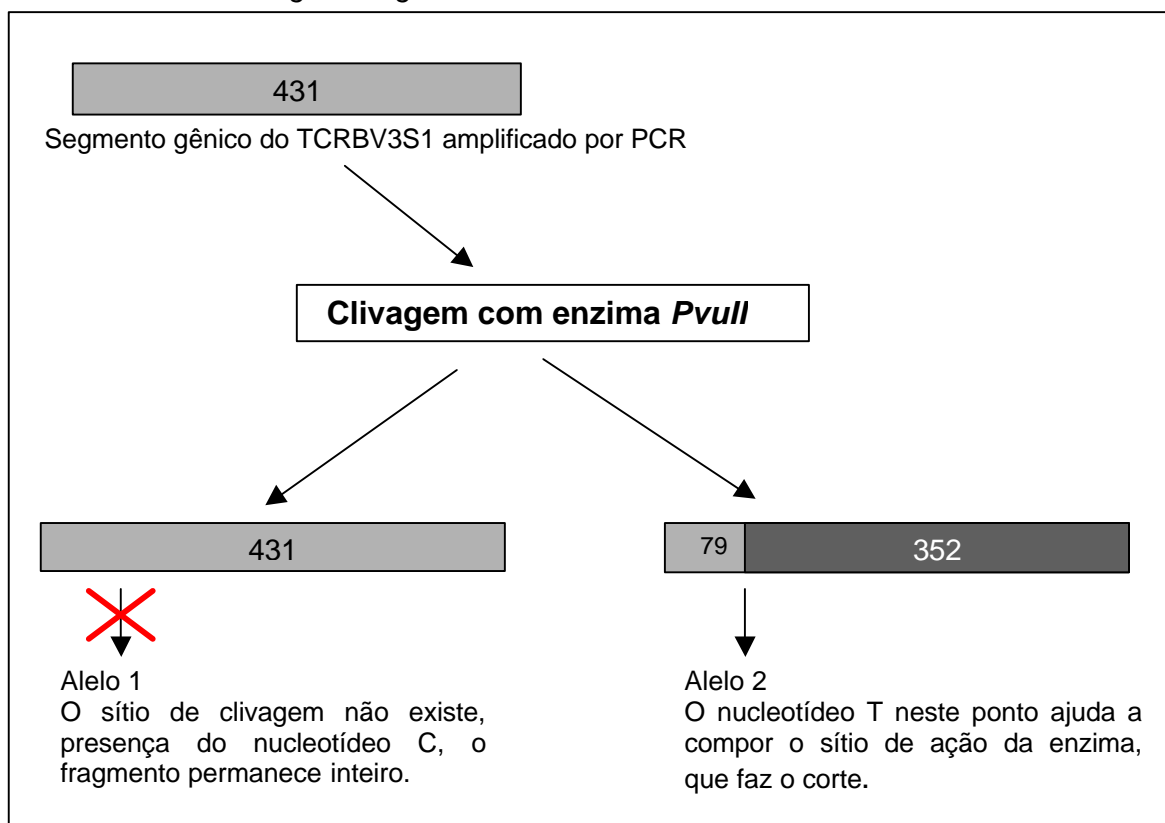


Figura 8 – Foto de gel de agarose 1% com os produtos da reação RFLP para TCRBV3S1. A seta “a” indica o padrão homocigoto do alelo 1, a seta “b” indica o homocigoto do alelo 2, enquanto a seta “c” indica o padrão heterocigoto.

### 3.4 PCR-RFLP do segmento gênico TCRBV18

Este segmento gênico foi amplificado por PCR com os *primers* 5'-ATTCATCAATGGCCAGCGAC-3' e 5'-GGAGCTTCTTAGAACTCA-3'(Charmley et al, 1993), a partir de DNA total. As reações foram feitas em um volume final de 25 $\mu$ L, preparadas da seguinte forma:

- \* 1 $\mu$ L de DNA total
- \* 1 $\mu$ L de *primers* (10pmol/ $\mu$ L cada)
- \* 1 $\mu$ L de dNTP (10 mM cada nucleotídeo)
- \* 1,5 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- \* 2,5 $\mu$ L de tampão 10X
- \* 0,2 $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5U/ $\mu$ L
- \* qsp H<sub>2</sub>O

A amplificação destas preparações foi feita em 40 ciclos de 1 minuto para desnaturação (94°C), 1 minuto para anelamento (60°C) e 2 minutos para extensão (72°C). Estes ciclos foram antecidos por 1 minuto a 94°C e sucedidos por 5 minutos a 72°C. O fragmento amplificado desta forma possui 235 pb. Para a verificação genotípica foi realizada a digestão de 10 $\mu$ L do produto de PCR com 10U da enzima *KpnI*, com incubação da preparação por 2 horas. No segmento de 235 pb existe um sítio polimórfico bialélico C/T. A presença do nucleotídeo C (alelo 1) caracteriza um sítio de restrição para a endonuclease *KpnI*, que cliva o DNA originando segmentos de 135 e 100 pb. Na presença do nucleotídeo T (alelo 2) este sítio não existe. Um esquema simplificado desta reação é apresentado na Figura 9. O produto da reação de clivagem com a enzima foi aplicado em gel de agarose 3% com brometo de etídeo e submetido à eletroforese (Figura 10). Indivíduos homozigotos para o alelo 1 são caracterizados pela presença de duas bandas, de 135 e 100 pb, enquanto indivíduos homozigotos para o alelo 2 são identificados pela presença apenas da banda original de 235 pb. Os indivíduos heterozigotos são identificados pela presença das 3 bandas possíveis (235, 135 e 100 pb) simultaneamente.

FIGURA 9 -- Esquema simplificado do ensaio RFLP realizado para análise genotípica do segmento gênico TCRBV18.

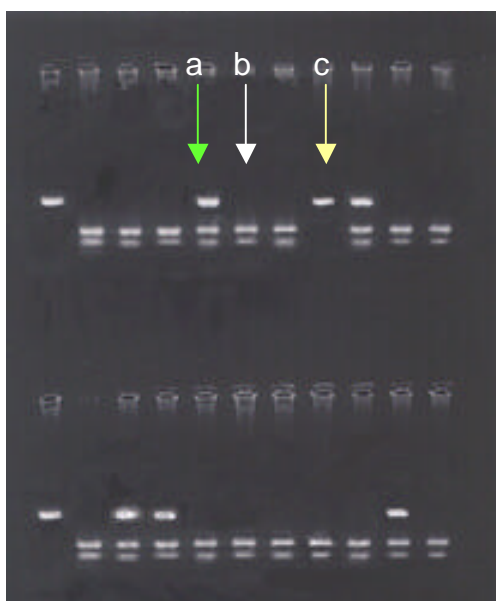
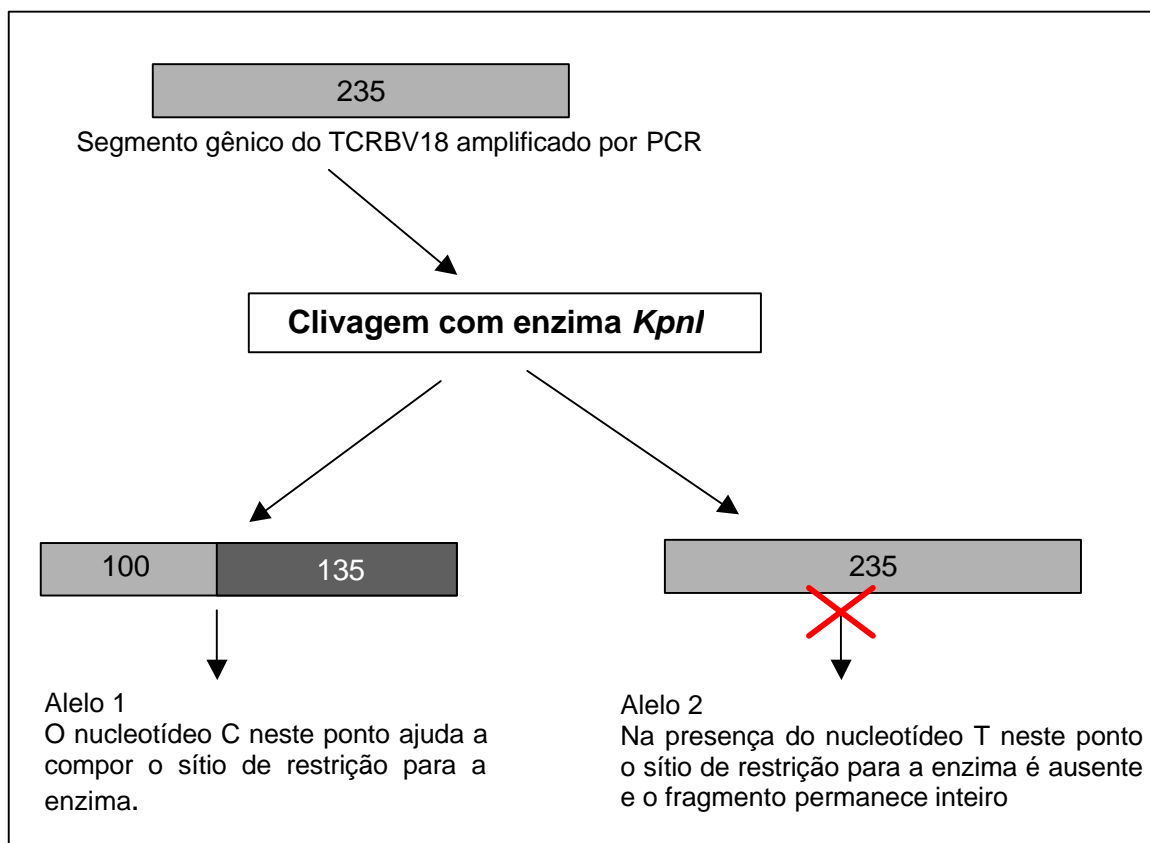


Figura 10 – Foto de gel de agarose 1% com os produtos da reação RFLP para TCRBV18. A seta “a” indica o padrão heterozigoto, a seta “b” indica o padrão homozigoto do alelo 1, enquanto “c” indica o homozigoto do alelo 2.

### 3.5 PCR-RFLP do segmento gênico TCRBV13S5

Para a análise do polimorfismo do segmento gênico TCRBCV13S5, as amostras foram amplificadas por PCR com *primers* específicos 5'-TGCTGGGATCACCCAGGCA-3' e 5'-CCAGTGGTACCTGCAGTATT-3'. Cada reação foi preparada para um volume total de 25 $\mu$ L, como descrito a seguir:

- \* 1 $\mu$ L de DNA total
- \* 1 $\mu$ L de *primers* (10pmol/ $\mu$ L cada)
- \* 1 $\mu$ L de dNTP (10 mM cada nucleotídeo)
- \* 1,5 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- \* 2,5 $\mu$ L de tampão 10X
- \* 0,2 $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5U/ $\mu$ L
- \* qsp H<sub>2</sub>O

As reações foram submetidas a 40 ciclos de 1 minuto para desnaturação (94°C), 1 minuto para anelamento (60°C) e 1 minuto para extensão (72°C). Estes ciclos foram antecidos por um período de 1 minuto a 94°C e sucedidos por 3 minutos a 72°C. O segmento amplificado por este procedimento possui 167 pb. Esta região contém um polimorfismo bialélico em que os dois alelos podem ser identificados através de clivagem com a endonuclease *HhaI*. O alelo 1 possui um sítio de restrição para esta enzima, que corta o segmento em dois segmentos menores, com 114 e 53 pb. No alelo 2 o sítio para a enzima *HhaI* está ausente. Um esquema simplificado desta reação é apresentado na Figura 11. Para a genotipagem, portanto, o produto de PCR foi adicionado da enzima *HhaI* (1U da enzima para cada 1 $\mu$ L do produto de PCR) e incubado por 3 horas a 37°C. Após este tratamento, o produto foi submetido à eletroforese e visualizado em gel de agarose 3,0% (Figura 12). Indivíduos homozigotos para o alelo 1 foram identificados pela presença apenas da banda original de 167 pb, que não é clivada. Já indivíduos homozigotos para o alelo 2 foram identificados 2 bandas, com 114 pb e 53 pb cada uma. Indivíduos heterozigotos foram caracterizados pela presença das bandas de 167, 114 e 53 pb, sendo que está última pode ser pouco nítida no gel de agarose 3% devido ao baixo peso molecular.

FIGURA 11 -- Esquema simplificado do ensaio RFLP realizado para análise genotípica do segmento gênico TCRBV13S5.

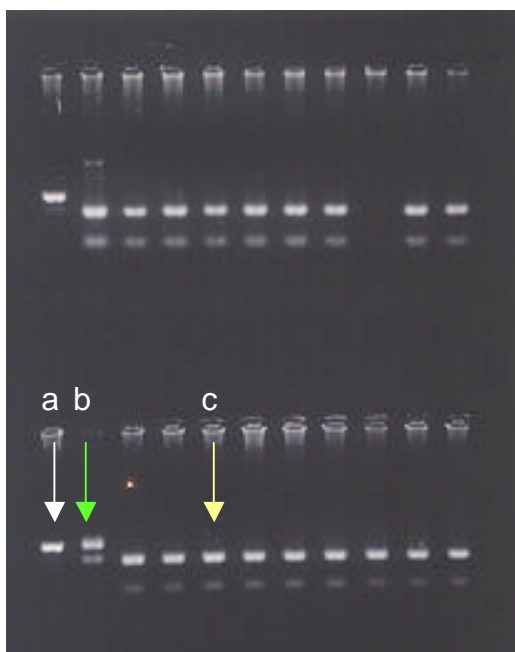
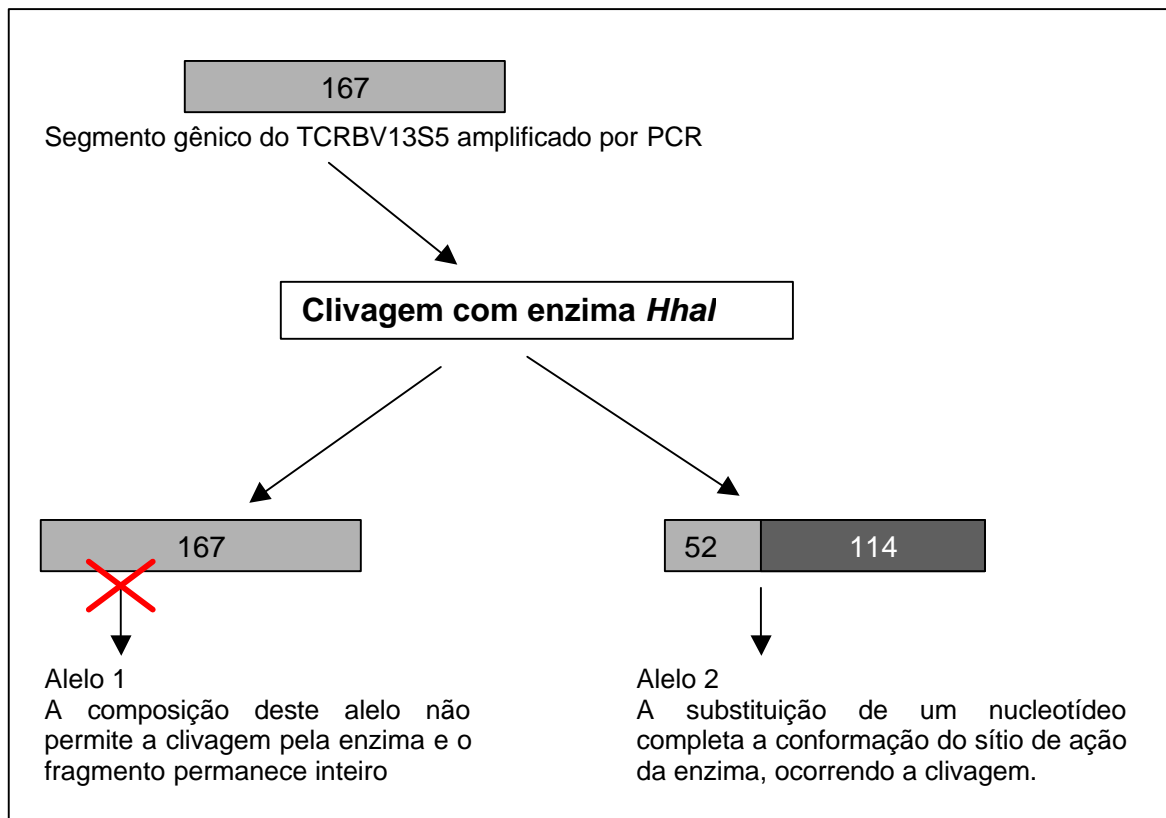


Figura 12 – Foto de gel de agarose 3% com os produtos da reação RFLP para TCRBV13S5. A seta “a” indica o padrão homocigoto do alelo 1, a seta “b” indica o padrão heterocigoto, enquanto a “c” indica o homocigoto do alelo2.

### 3.6 Análise por PCR do gene CCR5

Para a verificação da ocorrência do alelo  $\Delta 32$  do gene CCR5, as amostras foram submetidas à amplificação por PCR com *primers* específicos 5'-GGTCTTCATTACACCTGC-3' e 5'-AGGATTCCCGAGTAGCAGATG-3'. A preparação da reação, cujo volume final é 25 $\mu$ L, é feita da seguinte forma:

- \* 1 $\mu$ L de DNA total
- \* 1 $\mu$ L de *primers* (10pmol/ $\mu$ L cada)
- \* 1 $\mu$ L de dNTP (10 mM cada nucleotídeo)
- \* 1 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- \* 2,5 $\mu$ L de tampão 10X
- \* 0,2 $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5U/ $\mu$ L
- \* qsp H<sub>2</sub>O

Esta preparação foi submetida a 40 ciclos de 1 minuto para desnaturação (94°C), 1 minuto para anelamento (56°C) e 1 minuto para extensão (72°). Estes ciclos são precedidos por 1 minuto a 94°C e sucedidos por 3 minutos a 72°C. O produto obtido foi então submetido à eletroforese em gel de agarose 3,0% com brometo de etídeo (Figura 13). A amplificação das amostras de homozigotos para o alelo normal origina uma banda de 137 pb, enquanto a homozigose para a deleção é caracterizada por uma banda de 105 pb (esquema do ensaio na Figura 14). Os indivíduos heterozigotos são identificados pela presença de ambas as bandas simultaneamente.

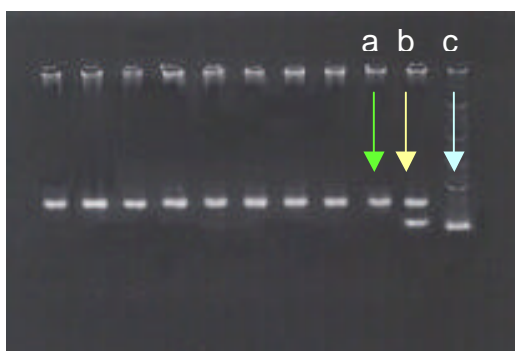
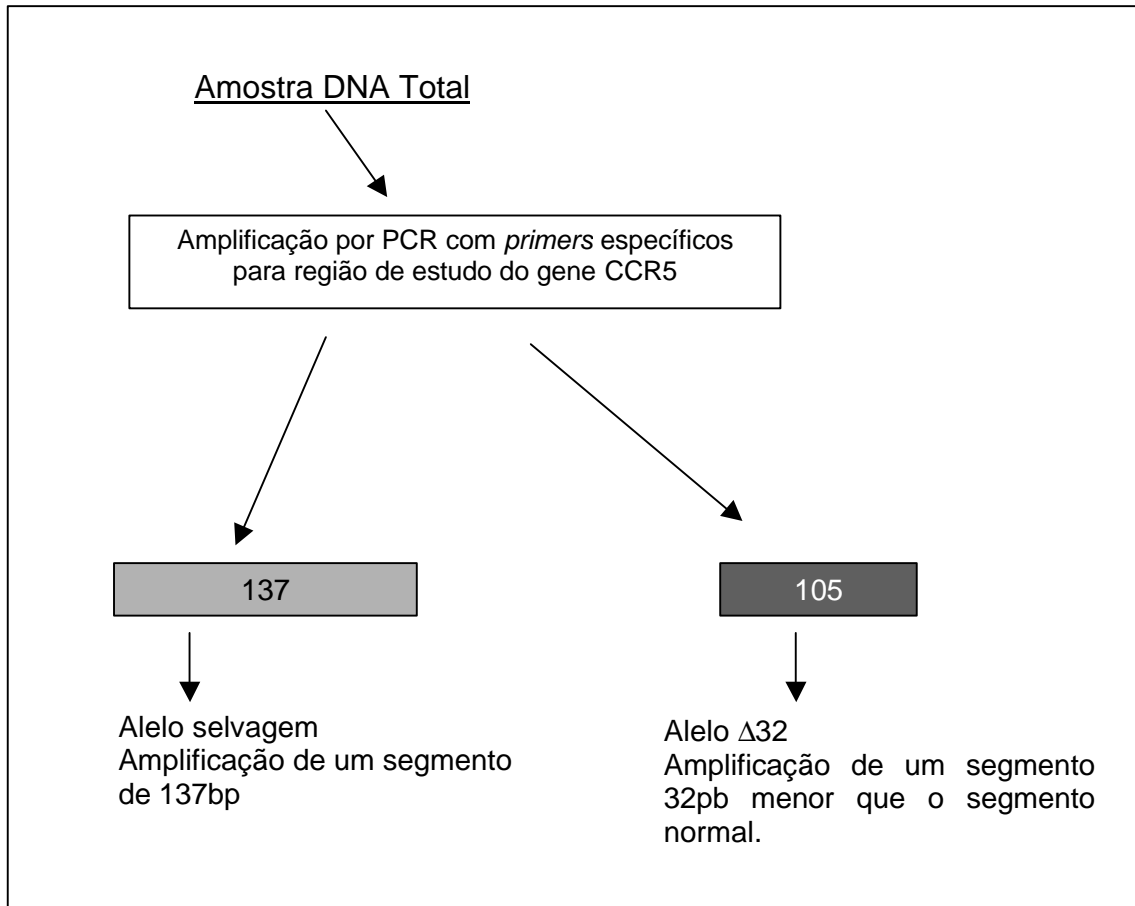


Figura 13 – Foto de gel de agarose 3% com os produtos da amplificação por PCR de região do gene CCR5. A seta “a” indica o homozigoto do alelo selvagem, a “b” indica o heterozigoto para a deleção  $\Delta 32$  enquanto a seta “c” indica o padrão molecular de 100 pb.



FIGURA 14 -- Esquema simplificado do ensaio realizado para análise genotípica do gene CCR5.



### 3.7 PCR-RFLP para o éxon 6 do gene do TNFR-II

O polimorfismo bialélico do éxon 6 (posição 196) do TNFR-II foi analisado a partir da amplificação por PCR com *primers* específicos, 5'-ACTCTCCTATCCTGCCTGCT-3' e 5'-TTCTGGAGTTGGCTGCGTGT-3'. A reação foi feita em um volume total de 25µL, sendo preparada como mostrado a seguir:

- \* 1µL de DNA total
- \* 1µL de *primers* (10pmol/µL cada)
- \* 1µL de dNTP (10 mM cada nucleotídeo)
- \* 1µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- \* 2,5µL de tampão 10X
- \* 0,2µL de Taq DNA polimerase 5U/µL
- \* qsp H<sub>2</sub>O

Esta preparação foi então submetida à 35 ciclos de 1 minuto para desnaturação (94°C), 1 minuto para anelamento (57°C) e 1 minuto para extensão (72°C). Estes ciclos foram precedidos por 1 minuto à 95°C e sucedidos por 3 minutos a 72°C. O fragmento obtido nesta amplificação possui 242 pb. A substituição de uma base (T/G) na posição 196 está correlacionada com presença ou ausência de um sítio de restrição para a enzima *NlaIII*. Quando o nucleotídeo encontrado nesta posição é a timina, o códon codifica uma metionina e o alelo chama-se M. Este alelo possui o sítio de restrição para a enzima *NlaIII*, que cliva o fragmento original de 242 pb em dois fragmentos de 133 pb e 109 pb. Um esquema simplificado desta reação é apresentado na Figura 15. O alelo R possui a guanina na posição 196 e codifica uma arginina no lugar da metionina, não possuindo o sítio de restrição para a enzima. Para a genotipagem, portanto, o produto de PCR sofre digestão pela endonuclease *NlaIII*. A reação é feita incubando-se 10µL do produto de PCR juntamente com 10U da enzima durante 16 horas a 37°C. Após este processo o material é submetido à eletroforese em gel de agarose 3,0% (Figura 16). A presença de uma única banda de 242 pb caracteriza o genótipo homozigoto para o alelo R.

A presença de duas bandas, com 133 e 109 pb, caracteriza o genótipo homozigoto para o alelo M. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença das três bandas, 242, 133 e 109 pb, simultaneamente.

FIGURA 15 -- Esquema simplificado do ensaio RFLP realizado para análise genotípica da posição 196 do éxon 6 do gene do TNFR-II.

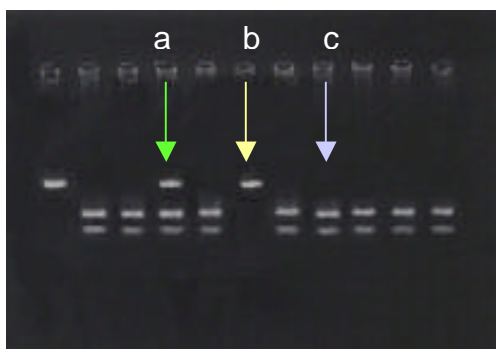
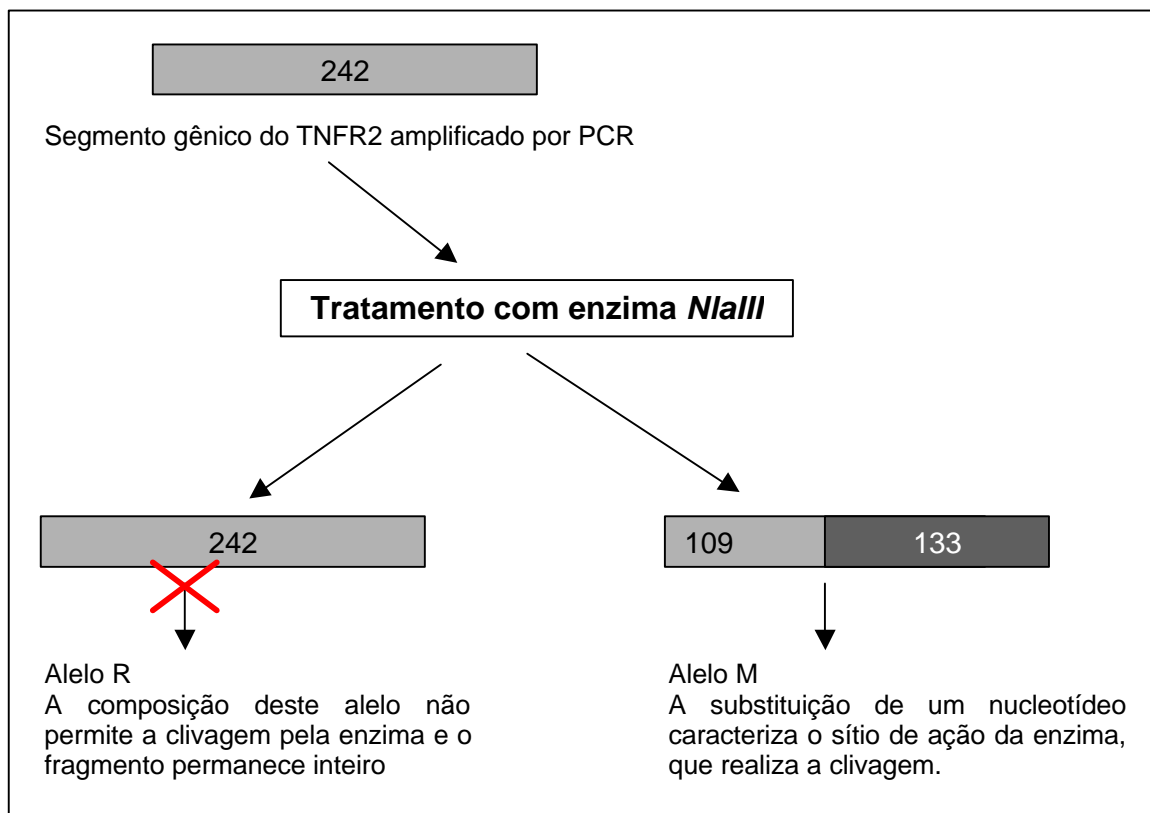


Figura 16 – Foto de gel de agarose 3% com os produtos da reação RFLP para polimorfismo do éxon 6 do TNFR-II. A seta “a” indica o padrão heterozigoto, a seta “b” indica o padrão homozigoto do alelo 196R, a seta “c” indica o padrão homozigoto do alelo 196M.

### 3.8 PCR-RFLP para região promotora do gene da IL-10

A análise do polimorfismo da posição -597 da região promotora do gene da IL-10 teve início com a amplificação por PCR, com *primers* específicos, de um segmento gênico englobando o ponto de interesse. Os *primers* utilizados para esta amplificação foram 5'-ATCCAAGACAACACACTACTAA-3' e 5'-TAAATATCCTCAAAGTTCC-3'. A reação de amplificação foi preparada, para um volume final de 50 $\mu$ L, da seguinte forma:

- \* 1 $\mu$ L de DNA total
- \* 1 $\mu$ L de *primer* (10pmol/ $\mu$ L cada)
- \* 1 $\mu$ L de dNTP (10 mM cada nucleotídeo)
- \* 3 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- \* 5 $\mu$ L de tampão 10X
- \* 0,2 $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5U/ $\mu$ L
- \* qsp H<sub>2</sub>O

Esta preparação é submetida a 30 ciclos de 30 segundos para desnaturação (94°C), 30 segundos para anelamento (56°C) e 1 minuto para extensão (72°C). Estes ciclos foram precedidos por 1 minuto à 94°C e sucedidos por 3 minutos à 72°C. O fragmento amplificado possui 580 pb. O polimorfismo da posição -597 é devido à substituição de um nucleotídeo C por A. A presença da adenina na posição citada cria um sítio de restrição para a enzima *RsaI*. A digestão para genotipagem é feita incubando-se 10 $\mu$ L do produto de PCR adicionado de 10U da endonuclease *RsaI* a 37°C durante 2 horas. Após este tratamento o produto é submetido à eletroforese em gel de agarose 4,5% com brometo de etídeo (Figura 18). O fragmento inicial possui ainda mais dois pontos de clivagem para a *RsaI*, mas estes sítios são monomórficos e não interferem na genotipagem. O alelo C, após o tratamento com a enzima, é clivado em 3 fragmentos menores de tamanhos 306, 232, e 42 pb, enquanto o alelo A é clivado em 4 fragmentos, com 240, 232, 66 e 42 pb. Porém, no gel de agarose 4,5% não é possível visualizar qualquer diferença

entre as bandas de 232 e 240 pb. O que se observa são três bandas para o genótipo homocigoto para o alelo C, com 306, 232 e 42 pb, e 3 bandas para o genótipo homocigoto para o alelo A, com 240+232, 66 e 42 pb. O genótipo heterocigoto é identificado pela presença de quatro bandas, apresentando o padrão 306, 240+232, 66 e 42 (esquema simplificado da reação na Figura 17).

FIGURA 17 -- Esquema simplificado do ensaio RFLP realizado para análise genotípica Do SNP da região promotora de IL-10.

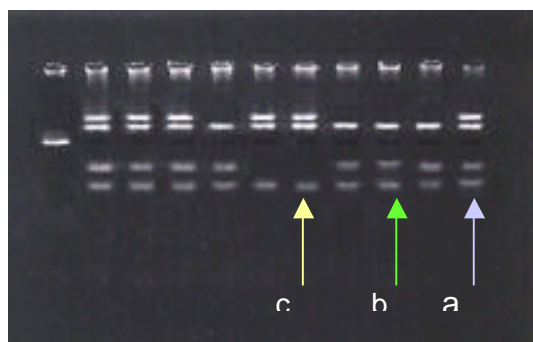
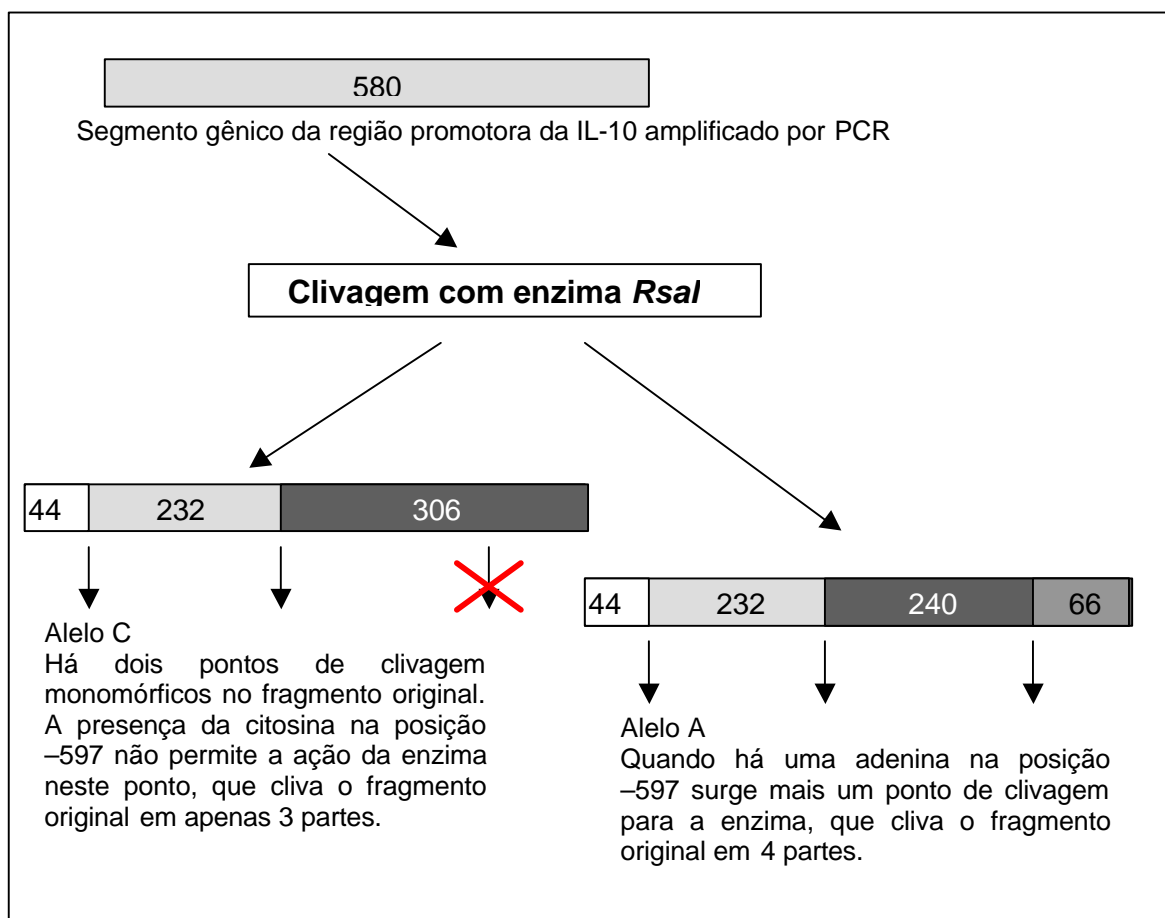


Figura 18 – Foto de gel de agarose 4,5% com os produtos da reação RFLP para IL-10. A seta “a” indica o padrão homocigoto do alelo A, a seta “b” indica o padrão heterocigoto, enquanto a seta “c” indica o homocigoto do alelo C.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Polimorfismos de segmentos gênicos do receptor de célula T**

Os três polimorfismos de TCR analisados estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população de indivíduos normais de origem japonesa, residentes em colônias do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Os genótipos para os loci TCRBV3S1, TCRBV13S5 e TCRBV18 de cada indivíduos são apresentados na Tabela 1. Foram analisados 105 indivíduos para TCRBV3S1, 118 indivíduos para TCRBV13S5 e 117 indivíduos para TCRBV18. As freqüências alélicas e genótípicas de cada um dos sistemas estão apresentadas nas Tabelas 2, 4 e 6.

Os dados obtidos nas análises da presente população foram comparados com freqüências alélicas e genótípicas de populações normais (caucasóides e afro-brasileiros) obtidas em outros estudos realizados em nosso laboratório. Essas comparações podem ser observadas nas Tabelas 3, 5 e 7. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre as freqüências dos alelos de TCRBV3S1 em Japoneses e as freqüências em caucasóides ( $p < 0,0001$ ) e afro-brasileiros ( $p < 0,0001$ ), sendo os dados das populações citadas apresentados na Tabela 3. Diferenças significantes também podem ser observadas entre as freqüências dos alelos de TCRBV13S5 em Japoneses quando comparadas, novamente, com caucasóides ( $p = 0,000$ ) e afro-brasileiros ( $p = 0,000$ ), comparação apresentada na Tabela 5. Já as freqüências dos alelos de TCRBV18 em Japoneses são estatisticamente diferentes das freqüências em indivíduos caucasóides ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferença estatística quando comparadas com as freqüências encontradas nos indivíduos afro-brasileiros ( $p > 0,1$ ), estando as freqüências destes grupos apresentadas na Tabela 7.

Tabela 1 -- Genótipos individuais para os sistemas polimórficos TCRBV3S1, TCRBV13S5 e TCRBV18.

indivíduos	TCRBV3	TCRBV18	TCRBV13S5
1	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
2	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
3	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
4	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
5	heterozigoto	heterozigoto	homozigoto 2
6	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
7	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
8	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
9	homozigoto 2	não determinado	homozigoto 2
10	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
11	homozigoto 2	heterozigoto	homozigoto 2
12	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
13	não determinado	heterozigoto	homozigoto 2
14	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
15	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
18	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
19	homozigoto 2	heterozigoto	homozigoto 2
20	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
21	não determinado	heterozigoto	não determinado
23	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
24	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
26	não determinado	heterozigoto	homozigoto 2
27	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
28	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
29	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
30	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
31	heterozigoto	homozigoto 1	heterozigoto
32	não determinado	não determinado	homozigoto 2
33	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2

indivíduos	TCRBV3	TCRBV18	TCRBV13S5
34	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
35	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
36	homozigoto 2	heterozigoto	homozigoto 2
37	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
38	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
39	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
40	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
41	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
42	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
43	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
44	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
45	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
46	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
47	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
48	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
49	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
50	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
51	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
52	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
53	heterozigoto	homozigoto 1	heterozigoto
54	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
55	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
56	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
57	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
58	não determinado	homozigoto 1	homozigoto 2
59	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
60	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
61	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
62	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
63	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
64	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2



indivíduos	TCRBV3	TCRBV18	TCRBV13S5
65	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
66	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
67	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
68	Não determinado	heterozigoto	homozigoto 2
69	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
70	heterozigoto	heterozigoto	homozigoto 2
71	homozigoto 2	heterozigoto	homozigoto 2
72	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
73	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
74	homozigoto 2	heterozigoto	homozigoto 2
75	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
76	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
77	heterozigoto	heterozigoto	homozigoto 2
78	homozigoto 1	heterozigoto	homozigoto 2
79	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
80	Não determinado	homozigoto 2	homozigoto 2
81	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
82	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
84	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
85	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
86	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
87	homozigoto 2	heterozigoto	homozigoto 2
88	heterozigoto	heterozigoto	homozigoto 2
89	heterozigoto	heterozigoto	homozigoto 2
90	heterozigoto	heterozigoto	homozigoto 2
91	heterozigoto	heterozigoto	homozigoto 2
92	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
93	homozigoto 1	heterozigoto	homozigoto 2
94	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
95	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2

indivíduos	TCRBV3	TCRBV18	TCRBV13S5
96	heterozigoto	homozigoto 1	heterozigoto
97	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
98	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
99	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
100	heterozigoto	homozigoto 1	heterozigoto
101	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
102	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
103	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
104	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
105	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
106	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
107	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
108	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
109	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
110	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
111	homozigoto 2	heterozigoto	homozigoto 2
112	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
113	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
114	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
115	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
116	homozigoto 2	heterozigoto	homozigoto 2
117	homozigoto 2	heterozigoto	homozigoto 2
118	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
119	heterozigoto	homozigoto 1	homozigoto 2
120	homozigoto 1	homozigoto 1	homozigoto 2
121	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
122	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
123	heterozigoto	heterozigoto	homozigoto 2
124	homozigoto 2	homozigoto 1	homozigoto 2
n = 119	n = 105	n = 117	n = 118

Tabela 2 – Freqüências alélicas observadas e freqüências genótípicas observadas e esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg na análise do segmento gênico TCRBV3S1 na população de origem Japonesa do Sul do Brasil.

TCRBV3S1	11	12	22	alelo 1	alelo 2
observado	0,114 (12)	0,448 (47)	0,438 (46)	0,338	0,662
esperado	0,114 (11,995)	0,448 (46,989)	0,438 (46,016)	#	#

$$\chi^2 = 1,0 \quad gl = 1 \quad p = 0,317$$

Tabela 3 – Freqüências alélicas e genótípicas para o polimorfismo do segmento gênico TCRBV3S1 observadas na população de origem Japonesa do Sul do Brasil e freqüências alélicas e genótípicas encontradas nas populações caucasóide e afro-brasileira.

TCRBV3S1	japoneses	caucasóides*	afro-brasileiros*
alelo 1	0,338	0,545	0,685
alelo 2	0,662	0,455	0,315
Homozigoto 1	0,114	0,318	0,507
heterozigoto	0,448	0,455	0,356
Homozigoto 2	0,438	0,277	0,137
Total de indivíduos	105	66	73

Japonesa x caucasóides  $\chi^2 = 17,999$  gl = 1 p < 0,0001

Japoneses x afro-brasileiros  $\chi^2 = 51,860$  gl = 1 p < 0,0001

\*Dresch et al, 20002.

Tabela 4 – Frequências alélicas observadas e frequências genótípicas observadas e esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg na análise do segmento gênico TCRBV13S5 na população de origem Japonesa do Sul do Brasil.

TCRBV13S5	11	12	22	alelo 1	alelo 2
observado	0,000 (00)	0,034 (04)	0,966 (114)	0,017	0,983
esperado	0,0003 (0,035)	0,0337 (3,977)	0,966 (113,988)	#	#

$$\chi^2 = 0,035 \quad gl = 1 \quad p = 0,852$$

Tabela 5 – Frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo do segmento gênico TCRBV13S5 observadas na população Japonesa de origem Japonesa do Sul do Brasil e frequências alélicas e genótípicas encontradas nas populações caucasóide e afro-brasileira.

TCRBV13S5	japoneses	caucasóides*	afro-brasileiros*
alelo 1	0,017	0,133	0,116
alelo 2	0,983	0,867	0,884
homozigoto 1	0	0,013	0
heterozigoto	0,034	0,24	0,232
homozigoto 2	0,966	0,747	0,768
Total de indivíduos	118	79	92

Japonesa x caucasóides  $\chi^2 = 25,313$  gl = 1 p < 0,0001

Japoneses x afro-brasileiros  $\chi^2 = 20,337$  gl = 1 p < 0,0001

\*Nornberg e Mello, comunicação pessoal.

Tabela 6 – Frequências alélicas observadas e frequências genóticas observadas e esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg na análise do segmento gênico TCRBV18 na população de origem Japonesa do Sul do Brasil.

TCRBV18	11	12	22	alelo 1	alelo 2
observado	0,795 (93)	0,196 (23)	0,008 (01)	0,893	0,107
esperado	0,797 (93,249)	0,192 (22,464)	0,011 (1,287)	#	#

$\chi^2 = 0,077$  gl = 1 p = 0,781

Tabela 7 – Frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo do segmento gênico TCRBV18 observadas na população Japonesa de origem Japonesa do Sul do Brasil e frequências alélicas e genóticas encontradas nas populações caucasóide e afro-brasileira.

TCRBV18	japoneses	caucasóides*	afro-brasileiros*
alelo 1	0,893	0,806	0,934
alelo 2	0,107	0,194	0,057
homozigoto 1	0,795	0,663	0,885
heterozigoto	0,196	0,287	0,115
homozigoto 2	0,008	0,05	0
Total de indivíduos	117	80	61

Japonesa x caucasóides  $\chi^2 = 6,800$  gl = 1 p = 0,018  
 Japoneses x afro-brasileiros  $\chi^2 = 2,760$  gl = 1 p = 0,193

\*Dresch et al, 2000.

## 4.2 Polimorfismo D32 do CCR5

Através da análise de DNA de 117 indivíduos da população de origem Japonesa do Sul do Brasil, verificamos que todos possuem genótipo CCR5+/CCR5+, não sendo verificada a presença do alelo CCR5 $\Delta$ 32 em nenhum deles. Portanto, a população estudada mostrou-se monomórfica para o CCR5 normal. Da listagem apresentada na Tabela 8, apenas não foram genotipados os indivíduos de números 32 e 98.

## 4.3 Polimorfismo do éxon 6 do gene do TNFR-II

A análise do polimorfismo do éxon 6 do gene do TNFR-II abrangeu 79 indivíduos da amostra. Este sistema não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os genótipos referentes aos indivíduos analisados são apresentados na Tabela 8. As frequências alélicas e genotípicas (observadas e esperadas) são demonstradas na Tabela 9. O teste de  $\chi^2$  foi aplicado para a comparação estatística entre as frequências genotípicas com populações de outras etnias. Na Tabela 10, apresentamos as frequências alélicas e genotípicas encontradas na população Japonesa em paralelo às frequências observadas em populações caucasóide e afro-brasileira do sul do Brasil. Não há diferença significativa entre a população estudada e a população afro-brasileira do sul do Brasil ( $p = 0,093$ ). A comparação das frequências encontradas para o sistema TNFR-II na população de origem japonesa e as frequências de uma população caucasóide do sul do Brasil, no entanto, indicou diferença significativa ( $p = 0,01$ ).

Tabela 8 – Genótipos dos sistemas polimórficos da região promotora do gene da IL-10 e do éxon 6 do gene do TNFR-II para os indivíduos da população estudada; sexo e cidade de origem dos mesmos indivíduos.

Indivíduos	IL-10	TNFR2	SEXO	Local de Nascimento
1	não determinado	não determinado	M	Kagoshima
2	AA	MM	M	Kumamoto
3	AC	não determinado	M	Porto Alegre (Brasil)
4	AA	não determinado	F	Kumamoto
5	AC	não determinado	M	Kagoshima
6	AA	MM	M	Kagoshima
7	AA	não determinado	F	Kagoshima
8	não determinado	não determinado	F	Kagoshima
9	AA	não determinado	M	Kagoshima
10	AA	RR	M	Nagasaki
11	AA	MM	M	Miyazaki
12	não determinado	não determinado	F	Kobe
13	AC	não determinado	F	Hokkaido
14	não determinado	não determinado	F	Kagoshima
15	AC	MM	M	Kagoshima
18	não determinado	não determinado	F	Kagoshima
19	AC	MM	M	Nagasaki
20	AA	MM	M	Kumamoto
21	não determinado	não determinado	F	Moji das Cruzes (Brasil)
23	AA	MM	M	Miyazaki
24	AA	MM	F	Yokoama
26	não determinado	RR	F	Iwato
27	AC	MM	F	Hokkaido
28	AA	MM	F	Kumamoto
29	não determinado	não determinado	M	Hokkaido
30	AC	não determinado	F	Nagasaki
31	não determinado	não determinado	F	Hokkaido
32	não determinado	não determinado	F	Hokkaido
33	AA	não determinado	M	(Brasil)

Indivíduos	IL-10	TNFR2	SEXO	Local de nascimento
34	AC	não determinado	F	Kumamoto
35	AC	MM	F	Japão
36	AA	MM	M	Saitama
37	CC	MM	M	Kumamoto
38	não determinado	MM	F	Hokkaido
39	AC	MM	M	Hokkaido
40	AC	RR	F	Kumamoto
41	CC	MM	F	Hokkaido
42	AA	MM	M	Kumamoto
43	AA	MM	M	Kumamoto
44	AA	MM	F	Kumamoto
45	AA	MR	F	Kumamoto
46	AA	MM	M	Kumamoto
47	AC	MM	F	Oita
48	AC	MR	F	Yamanashi
49	AC	MM	M	Kumamoto
50	AC	MM	F	Kumamoto
51	AA	MM	M	Kumamoto
52	AA	MM	F	Kumamoto
53	AC	MM	F	Kumamoto
54	AC	MM	M	Kumamoto
55	CC	MM	M	Hokkaido
56	AA	não determinado	F	Hokkaido
57	AC	não determinado	F	Kumamoto
58	AC	MM	F	Fukuoka
59	AA	MM	M	Kumamoto
60	AA	MM	F	Kumamoto
61	AA	MM	M	Hokkaido
62	AC	MM	F	Kumamoto
63	AC	MM	F	Kumamoto
64	AA	MM	F	Cachoeira do Sul (Brasil)



Indivíduos	IL-10	TNFR2	SEXO	Local de Nascimento
65	AA	MR	M	Kochi
66	CC	MM	F	Kochi
67	CC	MM	M	Ishikawa
68	CC	MM	F	Ishikawa
69	CC	MM	M	Hokkaido
70	AC	não determinado	F	Hokkaido
71	AA	não determinado	M	Saga
72	AC	não determinado	M	Hokkaido
73	AC	não determinado	M	Kochi
74	AA	não determinado	F	Hokkaido
75	AC	não determinado	F	Hokkaido
76	AA	não determinado	M	Hokkaido
77	AC	não determinado	F	Hokkaido
78	AC	não determinado	F	Hokkaido
79	CC	não determinado	M	Hokkaido
80	AC	MR	F	Osaka
81	AA	MM	M	Akito
82	AA	MR	F	Yamagushi
84	AC	MR	F	Osaka
85	AC	MM	M	Yamagushi
86	AA	MM	M	Hokkaido
87	CC	MR	F	Hokkaido
88	AA	MM	F	Hokkaido
89	CC	MM	M	Hokkaido
90	AC	MM	F	Hokkaido
91	CC	MM	M	Hokkaido
92	AA	MM	F	Hokkaido
93	AC	MM	M	Hokkaido
94	AC	MM	F	Shizuoka
95	AA	MM	M	Kumamoto

Indivíduos	IL-10	TNFR2	SEXO	Local de Nascimento
96	AC	MR	F	Kumamoto
97	CC	MR	F	Kumamoto
98	não determinado	não determinado	M	Kumamoto
99	AA	MM	M	Gumma
100	AA	MM	F	Gumma
101	AA	MR	M	Tokushima
102	AA	MR	F	Kagoshima
103	CC	MM	M	Hokkaido
104	AC	MM	F	Hokkaido
105	AC	não determinado	F	Hokkaido
106	AA	não determinado	M	Nagasaki
107	AC	não determinado	F	Kumamoto
108	AC	não determinado	M	Kagoshima
109	AA	não determinado	F	Kagoshima
110	CC	não determinado	F	Kumamoto
111	AC	não determinado	F	Alvares Machado (Brasil)
112	CC	não determinado	F	Andradina (Brasil)
113	AA	não determinado	F	Nagasaki
114	AA	não determinado	F	Yamagushi
115	CC	não determinado	F	Hokkaido
116	AA	não determinado	M	Kumamoto
117	AC	não determinado	F	Kumamoto
118	CC	não determinado	M	Nagasaki
119	AA	não determinado	M	Nagasaki
120	AC	não determinado	M	Kagoshima
121	AA	não determinado	F	Kumamoto
122	AA	não determinado	M	Nagasaki
123	não determinado	não determinado	M	Niigata
124	AA	não determinado	F	Kumamoto
n = 119	n = 106	n = 79		

Tabela 9 – Frequências alélicas observadas e frequências genotípicas observadas e esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg na análise do polimorfismo do éxon 6 do gene do TNFR-II na população de origem Japonesa do Sul do Brasil.

TNFR2	M/M	M/R	R/R	196M	196R
esperado	0,719 (56,809)	0,258 (20,36)	0,023 (1,825)	#	#
observado	0,759 (60)	0,177 (14)	0,063 (05)	0,848	0,152

$$\chi^2 = 7,746 \quad gl = 1 \quad p = 0,005$$

Tabela 10 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo de TNFR-II observadas na população de origem Japonesa do sul do Brasil e frequências alélicas e genotípicas encontradas nas populações caucasóide e afro-brasileira.

TNFR2	japoneses	caucasóides*	afro-brasileiros*
196M	0,848	0,844	0,769
196R	0,152	0,156	0,231
M/M	0,759	0,687	0,628
M/R	0,177	0,312	0,282
R/R	0,063	0	0,089
Total de indivíduos	79	41	62

Japonesa x caucasóides  $\chi^2 = 6,633$  gl = 1 p = 0,010

Japoneses x afro-brasileiros  $\chi^2 = 2,816$  gl = 1 p = 0,093

\*Nornberg e Mello, comunicação pessoal.

#### 4.4 Polimorfismo da região promotora do gene da IL-10

A análise das freqüências genotípicas do polimorfismo da posição -597 da região promotora do gene da IL-10 mostrou que o sistema está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população Japonesa que estudamos. As freqüências alélicas e genotípicas observadas estão apresentadas na Tabela 11. Os genótipos individuais estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 11 – Freqüências alélicas observadas e freqüências genotípicas observadas e esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg na análise do polimorfismo da região promotora do gene da IL-10 na população de origem Japonesa do Sul do Brasil.

IL-10	AA	AC	CC	alelo A	alelo C
observado	0,454 (48)	0,386 (41)	0,160 (17)	0,646	0,354
esperado	0,417 (43,785)	0,457 (47,985)	0,125 (13,125)	#	#

$\chi^2 = 2,527$  gl = 1 p= 0,112

## 4.5 Análises de Sub-Populações

Dentro da população de indivíduos de origem japonesa do sul do Brasil separamos duas sub-populações de acordo com a origem geográfica dos indivíduos imigrantes, representativas do sul e do norte do Japão. Chamamos de Hokkaido a sub-população constituída de indivíduos da ilha de Hokkaido, no norte do Japão. A outra sub-população é representativa da ilha de Kyushu, no sul do Japão, sendo constituída de indivíduos provenientes de Kumamoto, Nagasaki e Kagoshima; esta sub-população foi chamada Kumamoto como referência à cidade que contribuiu com maior número de indivíduos. Dentre todos os sistemas analisados na população original, apenas três estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro das sub-populações apontadas. Para estes sistemas foi realizado o teste de  $\chi^2$  para melhor investigar as possíveis diferenças na distribuição das freqüências entre as sub-populações selecionadas. Os sistemas analisados nas sub-populações foram os polimorfismos de TCRBV3S1, TCRBV18 e da região promotora do gene da IL-10. As freqüências encontradas para os alelos e genótipos de TCRBV3S1 não apresentam diferenças entre as sub-populações Hokkaido e Kumamoto. Já as freqüências das variantes do TCRBV18 e região promotora do gene da IL-10 são significativamente diferentes entre os dois grupos (para o TCRBV18  $p = 0,001$  e para IL-10  $p = 0,003$ ). As Tabelas 12, 13 e 14 apresentam as freqüências alélicas e genotípicas encontradas nestas sub-populações e as freqüências alélicas e genotípicas encontradas na população total analisada.

Tabela 12 – Freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo do segmento gênico TCRBV3S1 observadas na população de origem Japonesa do sul do Brasil e freqüências alélicas e genotípicas encontradas nas sub-populações Hokkaido e Kumamoto.

TCRBV3S1	Pop. Total	Hokkaido	Kumamoto
Alelo 1	0,338	0,365	0,326
Alelo 2	0,662	0,635	0,674
homozigoto 1	0,114 (12)	0,154 (04)	0,087 (04)
heterozigoto	0,448 (47)	0,423 (11)	0,478 (22)
homozigoto 2	0,438 (46)	0,423 (11)	0,435 (20)
Total de indivíduos	105	26	46
Pop. total x Hokkaido	$\chi^2 = 0,291$	gl = 1	p < 0,590
Pop. total x Kumamoto	$\chi^2 = 0,300$	gl = 1	p < 0,584
Hokkaido x Kumamoto	$\chi^2 = 0,759$	gl = 1	p < 0,384

Tabela 13 – Freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo do segmento gênico TCRBV18 observadas na população de origem Japonesa do sul do Brasil e freqüências alélicas e genotípicas encontradas nas sub-populações Hokkaido e Kumamoto.

TCRBV18	Pop. Total	Hokkaido	Kumamoto
Alelo 1	0,893	0,823	0,970
Alelo 2	0,107	0,177	0,030
homozigoto 1	0,795 (93)	0,645 (20)	0,940 (47)
heterozigoto	0,196 (23)	0,355 (11)	0,060 (03)
homozigoto 2	0,008 (01)	0,000 (00)	0,000 (00)
Total de indivíduos	117	31	50
Pop. total x Hokkaido	$\chi^2 = 3,616$	gl = 1	p = 0,057
Pop. total x Kumamoto	$\chi^2 = 6,580$	gl = 1	p = 0,010
Hokkaido x Kumamoto	$\chi^2 = 11,557$	gl = 1	p = 0,001

Tabela 14 – Freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene da IL-10 (posição -597) observadas na população de origem Japonesa do sul do Brasil e freqüências alélicas e genotípicas encontradas nas sub-populações Hokkaido e Kumamoto.

IL-10 (-597)	Pop. Total	Hokkaido	Kumamoto
alelo A	0,646	0,463	0,722
alelo C	0,354	0,537	0,278
homozigoto A	0,454 (48)	0,259 (07)	0,533 (24)
heterozigoto	0,386 (41)	0,408 (11)	0,378 (17)
homozigoto C	0,160 (17)	0,333 (09)	0,089 (04)
Total de indivíduos	106	27	45
Pop. total x Hokkaido	$\chi^2 = 5,076$	gl = 1	p < 0,024
Pop. total x Kumamoto	$\chi^2 = 1,692$	gl = 1	p < 0,133
Hokkaido x Kumamoto	$\chi^2 = 8,578$	gl = 1	p < 0,003

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho analisamos diferentes polimorfismos de genes ligados ao sistema imune em uma amostra de indivíduos de origem japonesa residentes no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Estes indivíduos são, em sua grande maioria, nascidos no Japão, tendo imigrado para o Brasil na década de 60. Cinco sistemas polimórficos SNP bialélicos de genes ligados ao sistema imune foram testados na população, sendo três de segmentos gênicos de TCR (TCRBV3S1, TCRBV13S5 e TCRBV18), um do gene do TNFR-II e um da região promotora do gene da IL-10. Um sexto sistema polimórfico de gene ligado ao sistema imune foi também analisado na população, sendo referente ao polimorfismo bialélico do CCR5, em que um dos alelos apresenta uma deleção de 32pb (CCR5 $\Delta$ 32). De um total de cerca de 630 indivíduos que compõem o banco de DNA do Laboratório de Geriatria e Gerontologia da PUCRS referente a uma população originária do Japão residente no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, analisamos 119 indivíduos. Nem todas as amostras de DNA puderam ser testadas para todos os seis sistemas polimórficos. Pelo menos 105 indivíduos foram analisados para cada sistema polimórfico anteriormente citado, com exceção de um sistema (TNFR-II), para o qual foram analisados 79 indivíduos.

Os polimorfismos de TCR são importantes à medida que podem alterar o repertório deste receptor antigênico, o que pode influenciar no estabelecimento de uma resposta imune contra determinados antígenos. Dentre os diversos polimorfismos existentes na região TCRBV, selecionamos os polimorfismos dos segmentos TCRBV3S1, TCRBV13S5 e TCRBV18 para serem estudados na população de origem japonesa do sul do Brasil. Para o segmento TCRBV3S1 foram analisados 105 indivíduos, 118 indivíduos para o



TCRBV13S5 e 117 indivíduos para o segmento TCRBV18. Estes três sistemas polimórficos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada, o que facilitou uma comparação dos dados obtidos com dados de outras populações.

O polimorfismo do TCRBV3S1 interfere na frequência com que este segmento é usado na recombinação somática para montagem do TCR pelas células. Indivíduos que são homozigotos para o alelo 1 têm o segmento V $\beta$ 3 expresso em menor número de células T periféricas do que indivíduos homozigotos para o alelo 2. Os resultados das análises realizadas na população de origem japonesa do Sul do Brasil mostram que a frequência do alelo 1 nesta população é de 0,338. Esta frequência chama a atenção por ser significativamente diferente ( $p < 0,001$ ) das frequências encontradas para TCRBV3S1 em populações normais de indivíduos caucasóides (alelo 1 = 0,545) e de indivíduos afro-brasileiros (alelo 1 = 0,685) do sul do Brasil (Dresch *et al*, 2002). Algumas doenças autoimunes parecem ser ativadas pela resposta a superantígenos, o que torna importante o estudo de segmentos gênicos envolvidos no reconhecimento dos mesmos, como é o caso do V $\beta$ 3. Isso é demonstrado em um trabalho com indivíduos afetados por dilatação cardiomiopática idiopática (Luppi *et al*, 1998). Este trabalho demonstrou o envolvimento de resposta imune mediada por superantígenos na patogênese da doença cardíaca, com frequência elevada nas células T V $\beta$ 3+ entre as células T infiltradas no miocárdio.

Além de ser importante no reconhecimento de superantígenos, o segmento V $\beta$ 3 parece estar envolvido na resposta imune em diferentes situações. Em células T periféricas e de lavado bronco-alveolar de pacientes com asma alérgica, são encontradas, em média, mais células T V $\beta$ 3+ do que em indivíduos controle (Wahlstrom *et al*, 2001). Em linfonodos de camundongos após transplante de medula óssea também é possível encontrar uma alta frequência de células T V $\beta$ 3+, o que sugere o seu envolvimento na reação enxerto versus hospedeiro (Annat e Dutartre, 1998). Poucos trabalhos têm sido realizados na tentativa de associar os polimorfismos do segmento

gênico TCRBV3S1 com doenças. Um trabalho realizado na Austrália em 2000 por Buhler *et al*, aponta uma associação do alelo 1 do TCRBV3S1 com o desenvolvimento de esclerose múltipla. Esta associação está relacionada com outros polimorfismos de genes ligados ao sistema imune (HLA e TCRB), o que não diminui o caráter interessante da associação estabelecida. Ao contrário, a associação conjunta de diferentes genes ligados ao sistema imune mostra a importância da caracterização imunogenética de diferentes populações como suporte para os estudos de determinação dos fatores genéticos envolvidos no estabelecimento de doenças.

O segmento gênico TCRBV18 foi analisado na população de indivíduos de origem japonesa residentes no sul do Brasil e apresentou uma frequência de 0,107 para o alelo nulo (alelo 2). Esta frequência é intermediária às frequências encontradas nas populações caucasóide e afro-brasileira do sul do Brasil (Dresch *et al*, 2002). A frequência encontrada na população estudada apresenta diferença estatisticamente significativa em relação à frequência encontrada nos indivíduos caucasóides (0,194;  $p < 0,05$ ), mas não há diferença estatisticamente significativa na comparação com a frequência apresentada pelos afro-brasileiros (0,057,  $p > 0,1$ ). O alelo nulo está em homozigose em apenas 1 dos 117 indivíduos analisados (0,8%). Na população de indivíduos caucasóides, chega a 5% o índice de homozigotos para o alelo nulo. O V $\beta$ 18 parece ser importante na montagem de certos tipos de resposta imune, uma vez que é encontrado em cerca de 3,4% dos linfócitos T circulantes de indivíduos que são capazes de produzir o segmento V $\beta$ 18 funcional (Choi *et al*, 1989). Os homozigotos para o alelo nulo do TCRBV18 têm, portanto, um furo no repertório de especificidades de TCR. Isto leva a crer que poderia haver nestes indivíduos uma deficiência na montagem de respostas imunes determinadas, uma vez que, potencialmente, uma gama de antígenos deixaria de ser reconhecida pelas células T. Essa característica pode parecer prejudicial ao indivíduo, no entanto alguns estudos sugerem que um furo no repertório de TCR pode trazer vantagens em algumas situações. Osman *et al*, 1999, mostraram que camundongos de uma linhagem com uma deleção no repertório

de TCRB eram incapazes de desenvolver artrite induzida em laboratório. Linhagens de camundongos contendo o haplótipo H2<sup>q</sup> (do complexo MHC) são suscetíveis à indução de artrite por injeções de colágeno. Uma linhagem de camundongos endocruzada que continha o haplótipo H2<sup>q</sup>, mas também possuía uma deleção na região V $\beta$  (incluindo o segmento TCRBV8), não desenvolvia artrite após a indução pelas injeções de colágeno. Desta forma o furo no repertório de TCR destes camundongos teve uma consequência positiva para os mesmos. Além disso, estudos mostram a participação do V $\beta$ 18 na patogênese da esclerose múltipla e da alergia a pó. No caso da esclerose múltipla, o segmento V $\beta$ 18 foi encontrado em grande proporção das células T do líquido céfalo-raquidiano de indivíduos afetados, sendo estas células T reativas contra mielina (Heard *et al*, 1999). Entre as células T circulantes de indivíduos alérgicos a pó, células T V $\beta$ 18+ foram observadas em maior frequência do que entre células T circulantes de indivíduos controles não alérgicos (Kircher *et al*, 2002). Assim, o fato de não poder montar respostas imunes baseadas no V $\beta$ 18 pode evitar o desenvolvimento de certas condições patológicas. Por outro lado, resultados opostos foram encontrados em indivíduos afetados por miastenia gravis, onde a frequência de células T V $\beta$ 18+ periféricas foi menor do que a frequência de células T em indivíduos controle (Navaneethan *et al*, 1998).

Em contraste com a população de origem japonesa do nosso estudo, algumas populações caucasóides apresentam frequências de até 11% de homozigose para o alelo 2 do TCRBV18 (Charmley *et al*, 1993). Apesar do V $\beta$ 18 estar envolvido em alguns processos patológicos, o polimorfismo analisado no presente trabalho ainda não foi diretamente associado com resistência ou suscetibilidade a nenhuma doença autoimune ou de fundo genético. Contudo, as diferenças significativas encontradas nas frequências alélicas de TCRBV18 em populações de etnias distintas podem contribuir para diferenças que existam no perfil de resposta imune, reforçando a necessidade de estabelecer o perfil imunogenético destas populações.

O terceiro polimorfismo de TCR analisado em nosso trabalho foi referente ao segmento gênico TCRBV13S5. As freqüências observadas na população de indivíduos de origem japonesa do sul do Brasil para este polimorfismo foram de 0,017 para o alelo 1 e 0,983 para o alelo 2. Estas freqüências são estatisticamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) das freqüências encontradas em populações de indivíduos caucásios (alelo 1 = 0,133) e afro-brasileiros (alelo 1 = 0,116) previamente estudadas em nosso laboratório (Nornberg e Mello, comunicação pessoal). O segmento V $\beta$ 13 é um dos componentes do repertório de TCR encontrado com maior freqüência em células T periféricas (cerca de 4,6%) de indivíduos livres de infecção (Muraro *et al*, 2002). Seu envolvimento em algumas situações patológicas como alergia a pólen (Breiteneder *et al*, 1997), tireoidite autoimune (Wang *et al*, 2001), cirrose hepática (Mayo *et al*, 1996) foi descrito, mas o mecanismo pelo qual ocorre sua influência nestas situações ainda não está esclarecido. Há vários polimorfismos descritos em segmentos gênicos da família V $\beta$ 13, porém os estudos de associação destes polimorfismos com doenças são poucos. O polimorfismo do segmento gênico TCRBV13S5 ainda não foi associado com nenhuma patologia específica, porém, uma variante da região promotora do segmento gênico TCRBV13S5 (TCRBV13S5P\*1) foi associada com o desenvolvimento de artrite reumatóide (AR) em indivíduos HLA-DR4+ (Mu *et al*, 1996). Isso sugere que diferenças na expressão do segmento TCRBV13S5 podem estar correlacionadas com a patogênese da artrite reumatóide. Extrapolando esta informação, podemos imaginar que não somente o nível de expressão do TCRBV13S5 esteja relacionado com artrite (ou com outras doenças), mas também que variantes polimórficas que resultem em alterações na seqüência de aminoácidos deste segmento possam ser responsáveis por diferenças na afinidade do receptor pelo antígeno e, conseqüentemente, pelo estabelecimento e desenvolvimento de um processo autoimune. Desta forma, é importante a caracterização das freqüências alélicas de polimorfismos do segmento gênico TCRBV13S5 em populações normais de diferentes etnias,

fornecendo subsídios para o estudo de associação entre este importante segmento gênico e a manifestação de diferentes patologias.

O CCR5 apresentou monomorfismo na população de origem japonesa do sul do Brasil com relação à ausência do alelo CCR5 $\Delta$ 32, o qual não foi encontrado em nenhum dos 117 indivíduos analisados. Este dado está de acordo com o esperado, uma vez que o alelo  $\Delta$ 32 não é relatado em japoneses. Como nossa amostra é constituída principalmente de indivíduos nascidos no Japão antes de 1950, sendo apenas 6 brasileiros descendentes diretos dos imigrante japoneses, a possibilidade de encontrar o alelo  $\Delta$ 32 era remota. A presença do alelo CCR5 $\Delta$ 32 nesta população indicaria a miscigenação com indivíduos de ascendência caucasóide ainda no Japão. Como o Japão é geograficamente separado do continente asiático e extremamente distante das regiões de ocupação caucasóide, era de se esperar a ausência do polimorfismo. Esta ausência, no entanto, não descarta uma miscigenação da população imigrante japonesa com populações caucasóides, uma vez que, sendo baixa a frequência do CCR5 $\Delta$ 32 (mesmo entre caucasóides) a probabilidade de que o alelo seja transferido para outra população também é reduzida.

A importância da verificação da presença da deleção CCR5 $\Delta$ 32 na população estudada vai além da investigação sobre possível miscigenação com caucasóides. O papel do CCR5 na resposta inflamatória torna importante o estudo do polimorfismo  $\Delta$ 32 em doenças que apresentam quadro de inflamação, como é o caso de algumas doenças autoimunes como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico. Além disso, a ausência de um receptor CCR5 funcional (o que acontece em indivíduos homocigotos CCR5 $\Delta$ 32) já foi associada à maior suscetibilidade a infecções diversas em camundongos (Dawson *et al*, 2000; Nansen *et al*, 2002).

Ainda em relação a alterações do sistema imune em humanos e polimorfismo de CCR5, há descrição de resistência apresentada por indivíduos homocigotos CCR5 $\Delta$ 32 à infecção por HIV-1 que possui tropismo por macrófagos. Os indivíduos heterocigotos para CCR5 $\Delta$ 32 não estão protegidos

contra a infecção, mas apresentam um retardamento no desenvolvimento da SIDA (síndrome de imunodeficiência adquirida) propriamente dita, que leva mais tempo para se manifestar que em indivíduos homocigotos para o alelo CCR5 normal. (Lucotte *et al*, 2001; Smith *et al.*, 1997). Esta resistência ao HIV proporcionada pelo alelo CCR5 $\Delta$ 32 incentivou o seu estudo em diversas populações. Estudos demonstram uma distribuição da frequência do alelo  $\Delta$ 32 na Europa em um sistema de clina norte-sul, isto é, a frequência do alelo é maior nas populações do norte (até 0,14) e declina gradativamente, atingindo os menores índices em populações do sul do continente (0,05) (Lucotte *et al*, 2001; Stephens *et al*, 1998). A análise das frequências do mesmo alelo em diversas populações da Europa e da Ásia demonstra igualmente um declínio gradual da presença do alelo CCR5 $\Delta$ 32 no sentido oeste-leste, até a sua ausência na Geórgia, Índia, China e Coreia (Stephens *et al*, 1998). No entanto, um estudo recente identificou a presença do CCR5 $\Delta$ 32 em populações chinesas com uma frequência de 0,01, e pode estar refletindo a ocorrência de fluxo gênico (Zhang *et al*, 2002). O fato da frequência do alelo CCR5 com a deleção ser alta em populações caucasóides, apesar de a mutação ser recente (entre 2000 e 700 anos atrás), reforça a teoria de que forças seletivas atuaram contribuindo para a manutenção do alelo na população. Indivíduos portadores do alelo CCR5 $\Delta$ 32 poderiam ter alguma vantagem, como menor taxa de mortalidade durante epidemias virais ou bacterianas, como a peste causada pela *Yersinia pestis*, e a sobrevivência diferencial destes indivíduos teria aumentado a frequência do alelo CCR5 $\Delta$ 32 nestas populações (Nansen *et al*, 2002; Stephens *et al*, 1998).

Recentemente outros polimorfismos de CCR5 foram descritos, alguns dos quais também apresentam alelos que codificam uma proteína defeituosa e não funcional. Alguns já foram encontrados em populações japonesas, e há indícios de que a influência destas variantes sobre o indivíduo seja semelhante à influência da variante CCR5 $\Delta$ 32, estando estes alelos também implicados em resistência ao vírus HIV (Blanpain *et al*, 2000).

O sistema polimórfico da posição -597 da região promotora do gene da IL-10 foi analisado em uma amostra de indivíduos de origem japonesa do sul do Brasil, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg nesta população. As frequências encontradas foram de 0,646 para o alelo A e 0,354 para o alelo C. Outros estudos vêm sendo feitos em nosso laboratório, visando à investigação das frequências destes alelos em populações caucasóides e afro-brasileiras do sul do Brasil. Até o momento, no entanto, a amostra analisada não é suficiente para que possa ser comparada com os dados obtidos na população de origem japonesa apresentados no presente trabalho. Porém outros grupos analisaram o polimorfismo da região promotora do gene da IL-10 em populações de diferentes etnias. Um trabalho realizado por Meenagh *et al*, 2002, aponta uma significativa variação nas frequências encontradas para os alelos da posição -597 do promotor de IL-10 em populações distintas. Em irlandeses a frequência do alelo A é 0,183 e em indivíduos de península arábica a frequência deste alelo é 0,247. Em indivíduos africanos (Zulus), a frequência do alelo A é 0,339 e em uma população do extremo oriente (chineses de Singapura), a frequência do alelo chegou a 0,673. Esses dados exemplificam a importante variação da frequência deste alelo em populações de diferentes etnias. A frequência encontrada em nosso trabalho para a população de origem japonesa do sul do Brasil (0,646) é bastante semelhante à encontrada na população Chinesa do trabalho supracitado (0,673) e também muito semelhante à frequência encontrada em japoneses saudáveis (0,672) (Tegoshi *et al*, 2002).

A variação dos níveis de expressão da IL-10 em diferentes situações patológicas incentivou o estudo de associação de polimorfismos da região promotora do gene que a codifica com doenças. Alguns dos polimorfismos mais estudados são os das posições -1087G/A, -824C/T e -597C/A. Estes polimorfismos são estudados tanto em conjunto (análise de haplótipos) como individualmente. Neste sentido, algumas associações já foram comprovadas, como a associação do haplótipo ACC com severidade de AR, associação do haplótipo GCC com SLE e associação do haplótipo ATA com nefrite em pacientes com SLE na China (Bidwell *et al*, 1999). Algumas associações dos

polimorfismos isolados já foram demonstradas, como do alelo -1087G com esquizofrenia (Chiavetto *et al*, 2002) e comprometimento renal em indivíduos lúpicos (Hurme *et al*, 1998). Em uma população japonesa, a variante alélica -597C está associada um subgrupo de indivíduos com diabetes tipo I (com alta produção de anticorpos anti-GAD) (Tegoshi *et al*, 2002). Alguns estudos de associação entre esses polimorfismos e doenças têm mostrado resultados contraditórios ou incoerentes com a patologia. Nesses casos, a discordância entre os resultados pode ser atribuída, entre outros fatores, às diferentes origens das populações estudadas. Um caso interessante é o estudo em que Hajeer *et al* (2002), não encontraram diferença significativa nas frequências dos haplótipos de -1087, -824 e -597, entre indivíduos com artrite reumatóide e o grupo controle. No mesmo trabalho estes autores encontraram associação de um haplótipo de baixa produção de IL-10 com um subgrupo de indivíduos com artrite reumatóide que apresenta características imunológicas esperadas para a alta produção da citocina. O interessante é observar que o grupo de indivíduos afetados por AR analisado no estudo é dito caucasóide, enquanto o grupo controle foi definido como “eticamente miscigenados”. Este exemplo reflete, mais uma vez, a importância da definição de padrões de frequências alélicas de genes em diferentes grupos étnicos.

O sistema polimórfico do TNFR-II não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população de origem japonesa analisada. Há duas hipóteses para explicar a ausência do equilíbrio de Hardy-Weinberg para este sistema na população estudada. A primeira hipótese é de que o desequilíbrio tenha sido ocasionado por um efeito de fundador. A outra hipótese é que, como o presente trabalho foi realizado com uma amostra geral de uma população, e não com um grupo selecionado de indivíduos, de forma que (considerando a possibilidade de um determinado alelo ou genótipo estar associado a uma patologia autoimune) a existência de indivíduos afetados por esta patologia na população estudada poderia causar uma distorção da frequência deste alelo encontrada nesta população.

Em nosso estudo foi constatada a existência de diferenças significativas nas frequências encontradas para o polimorfismo do TNFR-II



entre a população de origem japonesa e uma população caucasóide do sul do Brasil ( $p = 0,01$ ), mas não foi constatada diferença na comparação da população de origem japonesa com uma população de afro-brasileiros do sul do Brasil ( $p = 0,093$ ). Pode-se notar que a frequência encontrada nos japoneses para o alelo 196R (0,152) é semelhante às frequências citadas na literatura para populações japonesas normais. Um estudo, correlacionando o alelo 196R com lupus eritematoso sistêmico (SLE) em japoneses, mostrou que a frequência deste alelo no grupo controle (população normal de japoneses) era de 0,188 (Komata *et al*, 1999) frequência esta semelhante à encontrada em nosso trabalho. Bridges *et al*, 2002, estudaram as frequências dos alelos da posição 196 do éxon 6 do TNFR-II em populações de três diferentes etnias, separando grupos de indivíduos saudáveis e afetados por artrite reumatóide (AR). Diversas comparações foram realizadas, tendo sido constatadas diferenças significativas nas frequências do alelo 196R (196G) entre diferentes etnias, sendo as frequências do alelo citado de 0,27, 0,17 e 0,11 para caucasóides, afro-americanos e japoneses, respectivamente (populações de indivíduos saudáveis). As frequências do alelo 196R, em indivíduos com artrite agrupados por etnia, foram de 0,33 para caucasóides, 0,20 para afro-americanos e 0,14 para japoneses. Em nenhum destes grupos houve associação positiva entre artrite reumatóide e o alelo 196R, mas em todos os três grupos étnicos a sua frequência é levemente superior em indivíduos com AR do que nos respectivos grupos controles saudáveis. Isso sugere que o alelo 196R pode ter alguma relação com a patogênese da doença, porém seu papel seria apenas um entre vários fatores que atuam no desenvolvimento da artrite. O alelo 196R do TNFR-II também está associado com o desenvolvimento de SLE em indivíduos japoneses (Komata *et al*, 1999; Morita *et al*, 2001), mas não em caucasóides (Al-Ansari *et al*, 2000) e Coreanos (Lee *et al*, 2001). A análise funcional do TNFR-II demonstra que o alelo 196R não confere diferença na afinidade do receptor pelo TNF- $\alpha$  quando comparado com o alelo 196M. Especula-se que a diferença de um aminoácido conferida pela substituição do nucleotídeo T por G possa interferir na ligação da enzima responsável pela liberação do TNFR-II solúvel, o que pode ser importante na

patogênese de algumas doenças inflamatórias (Morita *et al*, 2001). Portanto, as diferenças genéticas encontradas no sítio 196 do TNFR-II poderiam influenciar a severidade de doenças e a resposta aos tratamentos, pontos que poderão ser mais bem esclarecidos com investigações mais detalhadas, que deverão utilizar os dados referentes a populações específicas como base.

Mesmo dentro da população de origem japonesa estudada no presente trabalho, podem ser identificadas sub-populações. Para verificar a existência de diferenças intrapopulacionais, caracterizamos duas sub-populações dentro da população de origem japonesa estudada. A primeira foi chamada Hokkaido, sendo composta pelos indivíduos imigrantes da província de Hokkaido, que é uma grande ilha no extremo norte do Japão (mapa da Figura 1). A segunda população foi chamada Kumamoto, e trata-se de um grupo representativo da população do sul do Japão, com indivíduos das cidades de Kumamoto, Nagasaki e Kagoshima, sendo estas cidades selecionadas por sua localização no extremo sul do Japão, proximidade uma das outras e número de indivíduos proveniente das mesmas. Comparações entre estas duas sub-populações indicaram a existência de diferenças estatisticamente significativas nas frequências dos alelos dos polimorfismos do gene da IL-10 ( $p = 0,003$ ) e do segmento gênico TCRBV18 ( $p = 0,001$ ). Estes dados enfatizam mais uma vez a importância da realização de caracterização imunogenética em diferentes populações. Isto fica ainda mais evidente quando pensamos que o Japão é um país de pequena extensão e com população relativamente homogênea quando comparado com países como o Brasil, e mesmo assim são encontradas diferenças marcantes no perfil imunogenético de duas sub-populações.

Os estudos de associação de polimorfismos gênicos com desenvolvimento de doenças têm, muitas vezes, apresentado resultados conflitantes. Problemas como a caracterização dos grupos de indivíduos afetados e indivíduos controle, a ampla gama de genes que podem ser testados e a possibilidade de muitos genes estarem envolvidos concomitantemente na patogênese de uma determinada doença, podem ser responsáveis pelas dificuldades encontradas nessa área da ciência. Contudo,

o estabelecimento do perfil imunogenético de populações de diferentes etnias e provenientes de diferentes localizações geográficas, pode auxiliar no progresso destes estudos. Neste sentido, nosso trabalho pretende contribuir para a caracterização imunogenética de uma população de indivíduos normais de etnia japonesa, imigrantes no sul do Brasil.

Este trabalho iniciou a caracterização imunogenética de uma população normal de etnia japonesa. Há possibilidade de ampliação do número amostral, bem como ampliação do quadro de sistemas polimórficos de genes ligados ao sistema imune a serem analisados. Além disso, uma pesquisa detalhada do histórico clínico dos indivíduos analisados poderá fornecer dados para o estudo da correlação de manifestações patológicas com os polimorfismos gênicos analisados.

## 6. CONCLUSÕES

Após a análise genotípica de seis diferentes sistemas polimórficos bialélicos em uma população de indivíduos de origem japonesa residentes no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, chegamos às seguintes conclusões:

- O sistema polimórfico TCRBV3S1 está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada e as freqüências alélicas observadas são de 0,338 para o alelo 1 e 0,662 para o alelo 2.
- O sistema polimórfico TCRBV13S5 está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada e as freqüências alélicas observadas são de 0,017 para o alelo 1 e 0,983 para o alelo 2.
- O sistema polimórfico TCRBV18 está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada e as freqüências alélicas observadas são de 0,893 para o alelo 1 e 0,107 para o alelo 2.
- O sistema polimórfico de IL-10 está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada e as freqüências alélicas observadas são de 0,646 para o alelo A e 0,354 para o alelo C.
- O sistema polimórfico de TNFR-II não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada e as freqüências alélicas observadas são de 0,848 para o alelo M e 0,152 para o alelo R.
- A população de origem japonesa estudada é monomórfica para o CCR5, sendo a variante CCR5 $\Delta$ 32 ausente nesta população.
- Há diferenças estatisticamente significativas entre freqüências encontradas na população de origem japonesa estudada e população caucasóide do sul do Brasil para os sistemas TCRBV3S1, TCRBV13S5, TCRBV18, TNFR-II e IL-10.

- Há diferenças estatisticamente significativas entre frequências encontradas na população de origem japonesa estudada e população afro-brasileira do sul do Brasil para os sistemas TCRBV3S1, TCRBV13S5 e IL-10.
- Há diferenças intrapopulacionais estatisticamente significativas entre os dois subgrupos estabelecidos com base na região geográfica de origem dos imigrantes para os sistemas TCRBV18 e IL-10.

## 7. SUMMARY

The frequencies of different allelic variants of genes involved in the development of an immune response were analyzed in a south Brazilian population (n=119) with Japanese origin. Biallelic polymorphisms from the CCR5, TNFR-II and IL-10 gene; TCRBV3S1, TCRBV18 and TCRBV13S5 gene segments were analysed by PCR-RFLP. Allelic frequencies were determined and compared with those obtained from other ethnic groups (Caucasoids and Afro-Brazilians). We observed the absence of the CCR5 $\Delta$ 32 in the tested population. The TCRBV3S1 and the TCRBV13S5 gene segments and the IL-10 gene polymorphisms analyzed showed allelic frequencies that differed from those observed in Caucasoids and Afro-Brazilians. The TCRBV18 gene segment polymorphism showed allelic frequencies that were statistically different from those of the Caucasoids. Also, the comparison of two subpopulations defined in our sample according to geographic origin in Japan showed differences between them for the allelic frequencies of the polymorphic genes TCRBV18 and IL-10. Those data indicate the existence of different immunogenetic patterns among different ethnic groups. Other SNPs in genes involved in the immune system will be tested and compared in our laboratory using these same populations.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ABBAS A.K., Lichtman A.H. & Pober J.S. (2000) Cellular and Molecular Immunology W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, fourth edition.
- AL- ANSARI A.S., Ollier W.E.R., Villarreal J., Ordi J., Teh L.S. & Hajeer A.H. (2000) Tumor Necrosis Factor Receptor II (TNFRII) Exon 6 Polymorphism in Systemic Lupus Erythematosus. *Tissues Antigens*, 55: 97-99.
- AL-LAMKI R.S., Wang J., Skepper J.N., Thiru S., Pober J.S. & Bradley J.R. (2001) Expression of Tumor Necrosis Factor Receptors in Normal Kidney and Rejecting Renal Transplants. *Laboratory Investigation*, 81: 1502-1515.
- ANNAT J. & Dutarte P. (1998) T cell repertoire expression in murine recipients of bone marrow transplant after LF 08-0299 (Tresperimus) administration. *Transplant Immunology*, 6 (4): 216-224.
- BALL E.J., Dombrowsky L., Hoover M., Capra J.D. & Stastny P. (1987) Restriction fragment length polymorphism of the human T cell receptor alpha gene. I. Two polymorphic restriction sites localized to different regions of the gene. *Immunogenetics*, 26 (1-2): 48-55.
- BARRON K.S. & Robinson M.A. (1994) The Human T-cell Receptor Variable Gene Segment TCRBV6S1 has two Null Alleles. *Human Immunology*, 40 (1): 17-19.

- BARTON A., John S., Ollier W.E.R., Silman A. & Worthington J. (2001) Association Between Rheumatoid Arthritis and Polymorphism of Tumor Necrosis Factor Receptor II, but not Tumor Necrosis Factor Receptor I, in Caucasians. *Arthritis and Rheumatism*, 44: 61-65.
- BIDWELL J., Keen L., Gallagher G., Kimberly R., Huizinga T., McDermott M.F., Oksenberg J., McNicholl J., Pociot F., Hardt C. & Alfonso S.D. (1999) Cytokine Gene Polymorphism in Human disease: on-line databases. *Genes and Immunology*, 1: 3-19.
- BLANPAIN C., Lee B., Tackoen M., Puffer B., Boom A., Libert F., Sharron M., Wittamer V., Vassart G., Doms R.W. & Parmentier M. (2000) Multiple Nonfunctional Alleles of CCR5 are Frequent in Various Human Populations. *Blood*, 96 (5): 1638-1645.
- BRADLEY J.R., Thiru S. & Pober J.S. (1995) Disparate Localization of 55-kd and 75-kd Tumor Necrosis Factor Receptors in Human Endothelial Cells. *American Journal of Pathology*, 146 (1): 27-32.
- BREITENEDER H., Friedl-Hajek R., Ebner C., Schenk S., Fischer G., Kraft D. & Scheiner O. (1996) Sequence comparisons of the CDR3 hyper-variable loops of human T cell receptors specific for three major T cell epitopes of the birch pollen allergen Bet v 1. *Molecular Immunology*, 33(13):1039-1048.
- BRIDGES S.L., Jenq G., Moran M., Kuffner T., Whitworth W.C. & McNicholl J. (2002) Single-Nucleotide Polymorphisms in Tumor Necrosis Factor Receptor Genes. *Arthritis and Rheumatism*, 46 (8): 2045-2050.
- BUHLER M.M., Bennetts B.H., Heard R.N. & Stewart G.J. (2000) T cell receptor beta chain genotyping in Australian relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis*, 6 (3): 140-147 .



- CHARMLEY P., Neptom B.S. & Concannon P. (1994) HLA and T Cell Receptor beta-chain DNA Polymorphisms Identify a Distinct Subset of Patients with Pauciarticular-onset Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 37: 695-143.
- CHEN F., Rowen L., Hood L. & Rothenberg E.V. (2001) Differential Transcription and Regulation of Individual TCR V beta Segments Before Gene Rearrangement. *Journal of Immunology*, 166: 1771-1780.
- CHIAVETTO L.B., Boin F., Zanardini R., Popoli M., Michelato A., Bignotti S., Tura G.B. & Gennarelli M. (2002) Association Between Promoter Polymorphic Haplotypes of Interleukin-10 Gene and Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 51: 480-484.
- CHIEN Y.H. & Davis M. (1993) How  $\alpha\beta$  T-Cell Receptors See Peptide/MHC Complexes. *Immunology Today*, 14: 957
- CHIES J.A.B. & Hutz M. (2003) High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36 (1): 71-75.
- CHIES J.A.B. & Hutz M. (1999) Alta Frequência do Alelo CCR5 $\Delta$ 32 em Indivíduos com Anemia Falciforme. *Genetics and Molecular Biology*, 22 Suppl:738.
- CONCANNON P, Gatti RA & Hood LE. (1987) Human T cell receptor V beta gene polymorphism. *Journal of Experimental Medicine*, 165 (4): 1130-40.
- CORNÉLIS F., Hardwick L., Flipo R.M., Martinez M., Lasbleiz S., Prud'Homme J.F., Tran T.H., Walsh S., Delaye A., Nico, A., Loste M.N., Lapage V.,

- Gibson *et al.* (1997) Association of rheumatoid arthritis with an amino acid allelic variation of the T cell receptor. *Arthritis and Rheumatism*, 40 (8): 1387-1390
- DAVIS M.M. & Bjorkman P.J. (1988) T-Cell Antigen Receptor Genes and T-Cell Recognition. *Nature*, 334: 395.
- DAWSON T.C., Beck M.A., Kuziel W.A., Henderson F. & Maeda N. (2000) Contrasting Effects of CCR5 and CCR2 Deficiency in the Pulmonary Inflammatory Response to Influenza Virus. *American Journal of Pathology*, 156(6): 1951.
- DEAN G.S., Tyrrel-Price J., Crawley E. & Isenberg D.A. (2000) Cytokines and Systemic Lupus Erythematosus. *Annals Rheumatology Disease*, 59. 243-251.
- DE INOCENCIO J., Choi E., Glass D.N. & Hirsch R. (1995) T cell receptor repertoire differences between African Americans and Caucasoids associated with polymorphism of the TCRBV3S1 (V beta 3.1) gene. *Journal of Immunology*, 154: 4836-4841.
- DE WAAL MALEFYT R., Abrams J., Bennett B., Figdor CG. & de Vries J.E. (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 174 (5) : 1209-1220.
- DIMITROV D.S., Xiao X., Chabot D.J. & Broder C.C. (1998) HIV Coreceptors. *Journal of Membrane Biology*, 166: 75–90.
- DRESCH, C., Nardi, N.B. & Chies, J.A.B. (2002) TCRBV3S1 and TCRBV18 Gene Segment Polymorphisms in Brazilian Caucasoid and Black Populations. *European Journal of Immunogenetics*, 29:11-15.

- ESKDALE J., Keijsers V., Huizinga T. & Gallagher G. (1999) Microsatellite Alleles and Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) Combine to Form Four Major Haplotypes Families at the Human Interleukin-10 (IL-10) Locus. *Genes and Immunology*, 1: 151-155.
- FAVOROVA O.O., Andreewski T.V., Boiko A.N., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kukalova O.G., Slanova A.V. & Gusev E.I. (2002) The Chemokine Receptor CCR5 Deletion Mutation is Associated with MS in a HLA-DR4 Positive Russians. *Neurology*, 59 (10): 1652-1655.
- FLYNN J.C., Fuller B.E., Giraldo A.A., Panos J.C., David C.S. & Kong Y. M. (2001) Flexibility of TCR Repertoire and Permissiveness of HLA-DR3 Molecules in Experimentals Autoimmune Thyroiditis in Nonobese Diabetic Mice. *Journal of Autoimmunity*, 17: 7-15.
- FOLCH G. & Lefranc M.P. (2000) The Human T cell Receptor Beta Variable (TRBV) Genes. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, 17: 42-54.
- GELLERT M. (2002) V(D)J Recombination: RAG Proteins, Repair Factors, and Regulation. *Nature*, 420(6914):429-34.
- GEURSEN A., Skinner M.A., Townsend L.A., Perko L.K., Farmiloe S.J., Peake J.S., Simpson I.J., Fraser J.D. & Tan P.L. (1993) Population Study of T-Cell Receptor Vbeta Gene Usage in Peripheral Blood Lymphocytes: Differences in Ethnic Groups. *Clinical and Experimental Immunology*, 94: 201.
- HAHN A.B., Kasten-Jolly J.C., Constantino D.M., Graffunder E. & Conti D.J. (2001) Promoter-Region Alleles of the TNF-alfa and IL-10 Genes Have no Effect on Pretransplant Allantibody Production. *Transplantation*, 72 (4): 739-742.

- HAHN A.B., Kasten-Jolly J.C., Constantino D.M., Graffunder E., Singh T.P., Shen G.K. & Conti D.J. (2001) TNF-alfa, IL-6, INF-gamma, and IL-10 Gene Expression Polymorphisms and the IL-4 Receptor alfa-chain Variant Q576R: Effects on Renal Allograft Outcome. *Transplantation*, 72 (4): 660-665.
- HAJEER A.H., Lazarus M., Turner D., Mageed R.A., Vencovsky J., Sinnott P., Hutchinson I.V. & Ollier W.E. (1998) IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 27 (2): 142-145.
- HEARD R.N.S., Teutsch S.M., Bennetts B.H., Lee S.D., Deane E.M. & Stewart G.J. (1999) Lack of restriction of T cell receptor  $\beta$  variable gene usage in cerebrospinal fluid lymphocytes in acute optic neuritis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 67 (11): 585-590.
- HERFARTH H., Pollok-Kopp B., Göke M., Press A. & Oppermann M. (2001) Polymorphisms of CC Chemokine Receptors CCR2 and CCR5 in Chron's Disease. *Immunology Letters*, 77: 113-117.
- HUANG D.F., Siminovitch K.A., Liu X.Y., Olee T., Olsen N.J., Berry C., Carson D.A. & Chen P.P. (1995) Population and Family Studies of Three Disease-Related Polymorphic Genes in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*, 95 (4): 1766-1772.
- HÜNEMEIER T., Hutz M.H. & Chies J.A.B. (2002) Caracterização de Polimorfismos de DNA em Genes Relacionados ao Sistema Imune em Índios Kaingang do Sul do Brasil. *Resumos do XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS*: 425-426.

- HURME M., Lahdenpohja N. & Santtila S. (1998) Gene Polymorphisms of Interleukins 1 and 10 in Infectious and Autoimmune Diseases. *Annals of Medicine*, 30 (5): 469-473.
- IBBERSON M., Peclat V., Guerne P.A., Tiercy J.M., Wordsworth P., Lanchbury J., Camilleri J. & So A.K. (1998) Analysis of T Cell Receptor V alpha Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 57 (1): 49-51.
- JONG B.A., Westendorp R.G.J., Eskdale J., Uitdehaag B.M.J. & Huizinga T.W.J. (2002) Frequency of Functional Interleukin-10 Promoter Polymorphisms is Different Between Relapse-Onset and Primary Progressive Multiple Sclerosis. *Human Immunology*, 63: 281-285.
- KAY R.A., Hutchings C.J. & Ollier W.E.R. (1995) A Subset of Sjögrens Syndrome Associates with the TCRBV13S2 Locus but Not the TCRBV2S1 Locus. *Human Immunology*, 42: 328-330.
- KIM E.Y. & Teh H.S. (2001) TNF Type 2 Receptor (p75) Lowers the Threshold of T Cell Activation. *Journal of Immunology*, 167: 6812-6820.
- KIRCH SA, Rathbun GA & Oettinger MA. (1998) Dual role of RAG2 in V(D)J recombination: catalysis and regulation of ordered Ig gene assembly. *EMBO Journal*, 17 (16): 4881-4886.
- KOCH W., Kastrati A., Böttiger C., Mehilli J., von Beckerath N. & Schömig A. (2001) Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms and Risk of Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction. *Atherosclerosis*, 159: 137-144.

- KOMATA T., Tsuchiya N., Matsuchita M., Hagiwara K. & Tokunaga K. (1999) Association of Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2) Polymorphisms Susceptibility with Systemic Lupus Erythematosus. *Tissues Antigens*, 53: 527-533.
- KUBE D., Rieth H., Eskdale J., Kresner P.G. & Gallagher G. (2001) Structural Characterisation of the Distal 5' Flanking Region of the Human Interleukin-10 Gene. *Genes and Immunology*, 2: 181-190.
- KUMAGAI-BRAESCH M., Boyle L, van den Elsen P. & Kurnick J.T. (1997) T cell receptor usage by HLA-DR3-specific T cell clones isolated from a renal allograft. *Transplant Immunology*, 5 (2): 129-135.
- LAHIRI D.K. & Nurnberger J.I. (1991) A Rapid Non-Enzymatic Method for the Preparation of HMW DNA from Blood for RFLP Studies. *Nucleic Acids Research*, 19, 5444.
- LANANI I., Bhol K. & Ahmed R. (1997) Interleukin-10: Biology, Role in Inflammation and Autoimmunity. *Annals os Allergy, Asthma & Immunology*, 79: 469-484.
- LEE E.B., Yoo J.E., Lee Y.J., Choi Y.J., Park K.S. & Song Y.W. (2001) Tumour Necrosis Factor Receptor 2 Polymorphism in Systemic Lupus Erythematosus: No Association with Disease. *Human Immunology*, 62: 1148-1152.
- LI Y., Szabo P., Robinson M.A., Dong B. & Posnett D.N. (1990) Allelic Variations in the Human T-Cell Receptor V $\beta$ 6.7 Gene Products. *Journal of Experimental Medicine*, 171: 221.

- LIM S., Crawley E., Woo P. & Barnes P. (1998) Haplotypes Associated with Low Interleukin-10 Production in Patients with Severe Asthma. *The Lancet*, 352:113.
- LUCOTTE G. (2001) Distribution of the CCR5 Gene 32-Basepair Deletion in West Europe. A Hypothesis about the Possible Dispersion of the Mutation by the Vikings in Historical Times. *Human Immunology*, 62: 933-936.
- LUPPI P., Rudert W.A., Zanone M.M., Stassi G., Trucco G., Finegold D., Boyle G.J., Del Nido P., McGowan F.X. & Trucco M. (1998) Idiopathic Dilated Cardiomyopathy: A Superantigen-Driven Autoimmune Disease. *Circulation*, 98: 777-785.
- MACIEJEWSKI JP, Risitano AM, Sloand EM, Wisch L, Geller N, Barrett JA, Young NS, Ristiano AM. (2002) A pilot study of the recombinant soluble human tumour necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein in patients with myelodysplastic syndrome. *Brazilian Journal of Haematology*, 117 (1):119-126.
- MAYO M.J., Combes B. & Jenkins R.N. (1996) T-Cell Receptor Vbeta Gene Utilization in Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* , 24(5):1148-55.
- MEENAGH A., Willians F., Ross O.A., Petterson C., Gogodezky C., Hammond M., Leheny W.A. & Middleton D. (2002) Frequency of Cytokine Polymorphisms in Populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Human Immunology*, 63: 1055-1061.
- MELLO A.C., Marasca J.A., Nardi N.B. & Chies J.A.B. (2002) Análise do polimorfismo do Receptor II do Fator de Necrose Tumoral (TNFRII) em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (SLE) do sul do Brasil. *Resumos do XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS*: 403-404.

- MIKAWA A.Y., Tagliavini S.A. & Costa P.J. (2002) CCR5 Genotype and Plasma  $\beta$ -Chemokine Concentration of Brazilian HIV-Infected Individuals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35: 1333-1337.
- MILLARD T.P., Kondeatis E., Cox A., Wilson A.G., Grabczynska S.A., Carey B.S., Lewis C.M., Khamashta M.A., Duff G.W., Hughes G.R.V., Hawk J.L.M., Vaughan R.W. & McGregor, J.M. (2001) A Candidate Gene Analysis of Three Related Photosensitivity Disorders: Cutaneous Lupus Erythematosus, Polymorphic Light Eruption and Actinic Prurigo. *British Journal of Dermatology*, 145 (2): 229-236.
- MITCHELL T.J., Walley A.J., Pease J.E., Venables P.J.W., Wiltshire S., Willians T.J. & Cookson W.O.C.M. (2000) Delta 32 Deletion of CCR5 Gene and Association with Asthma or Atopy. *The Lancet*, 356 (10): 1491-1492.
- MOK C.C., Lanchbury J.S., Chan D.W. & Lau CS. (1998) Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 41 (6): 1090-1095.
- MORITA C., Horiuchi T., Tsukamoto H., Hatta N., Kikuchi Y., Arinobu Y., Otsuka T., Sawabe T., Harashima S., Nagasawa K. & Niho Y. (2001) Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis and Rheumatism*, 44 (12): 2819-2827.
- MU H., Charmley P., King M.C. & Criswell L.A. (1996) Synergy between T Cell Receptor beta Gene Polymorphism and HLA-DR4 in Susceptibility to Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 39 (6): 931-937.



- MURARO P.A., Bonanni L., Mazzanti B., Pantalone A., Traggiai E. & Massacesi L. (2002) Short-Term Dynamics of Circulating T Cell Receptor V beta Repertoire in Relapsing-Remitting MS. *Journal of Neuroimmunology*, 127: 149-159.
- MURARO P.A., Jacobsen M., Necker A., Nagle J.W., Gaber R., Sommer N., Oertel W.H., Martin R. & Hemmer B. (2000) Rapid Identification of T Cell Expansion in Inflammatory Organ Diseases by Flow Cytometric T Cell Receptor V $\beta$  Analysis. *Journal of Immunological Methods*, 246. 131-143.
- NAGATA J., Kijima H., Hatanaka H., Tokunaga T., Takagi A, Mine T., Yamazaki H., Nakamura M. & Ueyama Y. (2002) Correlation between Interleukin 10 and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Esophageal Cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 10: 169-172.
- NAKASHIMA H., Akahoshi M., Tanaka Y., Yamaoka K., Ogami E., Nagano S., Arinobu Y., Niino H., Otsuka T. & Niho Y. (1999) Polymorphisms within the Interleukin-10 Receptor cDNA gene (IL10R) in Japanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatology*, 38: 1142-1144.
- NANSEN A., Christensen J.P., Andreasen S.O., Bartholdy C., Christensen J.E. & Thomsen A.R. (2002) The Role of CC Chemokine Receptor 5 in Antiviral Immunity. *Blood*, 99: 1237-1245.
- NEVES A.G., Salzano F.M., Hünemeier T., Nardi N.B. & Chies J.A.B. (2002) Análise da Frequência do Alelo CCR5  $\Delta$ 32 em Populações Indígenas Sul-Americanas. *Resumos do XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS*: 422.

- NISHIMURA M., Maeda M., Matsuoka M., Mine H., Saji H., Kuroda Y., Kawakami H. & Uchiyama T. (2000) Tumor Necrosis Factor, Tumor Necrosis Factor Receptors Type 1 and 2, Lymphotoxin- $\alpha$ , and HLA-DRB1 Gene Polymorphisms in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Associated Myeloapathy. *Human Immunology*, 61: 1262-1269.
- NORNBERG I.F., Marasca J.A., Nardi N.B. & Chies J.A.B. (2002) Análise de Polimorfismos do Promotor de Interleucina-10 em Pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (SLE) do Sul do Brasil. *Resumos do XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular*, 141.
- NORNBERG I.F., Mello A.C., Nardi N.B., & Chies J.A.B. (2002) Análise do Polimorfismo do Segmento Gênico TCRV $\beta$ 13S5 em Pacientes com Síndrome de Sjogrens do Sul do Brasil. *Resumos do XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS*: 440-441.
- NOWAK J., Rozentryt P., Szewczyk M., Gierlotka M., Duszanska A., Szygula B., Wojnicz R., Hawranek M., Polonski L. & Zembala M. (2002) Tumor Necrosis Factor Receptors sTNF-RI and sTNF-RII in Advanced Chronic Heart Failure. *Polish Archives in Medicine Wewn*, 107 (3): 223-229
- OSMAN G.E., Hannibal M.C., Anderson J.P., Lasky S.R., Ladiges W.C. & Hood L. (1999) FVB/N(H2(q)) Mouse is Resistant to Arthritis Induction and Exhibits a Genomic Deletion of T-Cell Receptor V beta Gene Segments. *Immunogenetics*, 49: 851-859.
- PASSOS Jr, G.A.S. & Picanço V.P. (1998) Frequency of the  $\Delta$ ccr5 Deletion Allele in the Urban Brazilian Population. *Immunology Letters*, 61: 205-207.

PERL A, Divincenzo JP, Gergely P, Condemi JJ, Abraham GN. (1989) Detection and mapping of polymorphic KpnI alleles in the human T-cell receptor constant beta-2 locus. *Immunology*, 67 (1): 135-138.

PERRY R.T., Collins J.S., Wiener H., Acton R. & Go R.C.P. (2001) The Role of TNF and its Receptors in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 22: 873–883.

POSNETT D.N. (1990) Allelic Variations of Human TCR V Gene Products. *Immunology Today*, 11: 368.

POSNETT D.N., Vissinga C.S., Pambuccian C., Wei S., Robinson M.A., Kostyu D. & Concannon P. (1994) Level of Human TCRBV3S1 (V beta 3) Expression Correlates with Allelic Polymorphism in the Spacer Region of the Recombination Signal Sequence. *Journal of Experimental Medicine*, 179: 1707-1711.

RANSOHOFF R.M. & Karpus W.J. (2001) Contemporary Clinical Neuroscience: Cytokines and Autoimmune Diseases. *Humana Press Inc., Totowa, NJ*, Cap.7.

ROBINSON M.A. (1989) Allelic Sequence Variations in the Hypervariable Region of a TCR  $\beta$  Chain: Correlation with Restriction Length Polymorphism in Human Families and Populations. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 86: 9422.

ROWEN L., Koop B.F. & Hood L. (1996) The Complete 685-kilobase DNA Sequence of the Human  $\beta$  T Cell Receptor Locus. *Science* 272:1755–1762

- SANTEE S.M. & Owen-Schaub L.B. (1996) Human Tumor Necrosis Factor Receptor p75/80 (CD120b) Gene Structure and Promoter Characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (35): 21151-21159.
- SANTOS S.B.M., Marasca J.A., Brenol J.C.T., Chies J.A.B. & Xavier R.M. (2002) Estudo dos receptores de linfócitos T Vbeta 3 e 18 e receptor de quimiocinas CCR5 em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Resumos do XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS*: 388.
- SARGEN K., Demaine A.G. & Kingsnorth A.N. (2000) Cytokine Gene Polymorphisms in Acute Pancreatitis. *Journal of the Pancreas*, 1(2):24-35.
- SARTONO E., van Eggermond M.C., Kurniawan A., Maizels R.M., van den Elsen P.J. & Yazdanbakhsh M. (1997) Selective Usage of Defined TCRBV Genes in Response to Filarial Antigens. *International Immunology*, 9(7):955-62.
- SIKES M.L., Suarez C.C., & Oltz E.M. (1999) Regulation of V(D)J Recombination by Transcriptional Promoters. *Molecular and Cellular Biology*. 19: 2773-2781
- SMITH M.W., Dean M., Carrington M., O'Brien S. J. *et al.* (1997) Contrasting Genetic Influence of CCR2 and CCR5 Variants on HIV-1 Infection and Disease Progression. *Science*, 277 (8): 959-965.
- STEPHENS J.C., Reich D.E., Goldstein D.B., Shin H.D., Smith M.W., Carrington M., Winkler C., *et al.* (1998) Dating the Origin of the CCR5-delta 32 AIDS - Resistance Allele by the Coalescence of Haplotypes. *American Journal of Human Genetics*, 62, 1507-1515.

SUBRAHMANYAN L., Eberle M.A., Clark A.C., Kruglyak L. & Nickerson D.A.. (2001) Sequence Variations and Linkage Disequilibrium in the Human T-Cell Receptor  $\beta$  (TCRB) Locus. *American Journal of Human Genetics*. 69: 381-395.

TAIN Y.L., Liu C.A. & Yang K.D. (2002) Implications of Blood Soluble and Cell Surface Tumor Necrosis Factor Receptors in Childhood Nephrotic Syndrome. *Pediatric Nephrology*, 17 (11): 926-932.

TARTAGLIA L.A., Goeddel D.V., Reynolds C., Figari I.S., Weber R.F., Fendly B.M. & Palladino Jr M.A. (1993) Stimulation of Human T-Cell Proliferation by Specific Activation of the 75-kDa Tumor Necrosis Factor Receptor. *Journal of Immunology*, 151 (9): 4637-4641.

TEGOSHI H., Hasegawa G., Obayashi H., Nakano K., Kitagawa Y., Fufui M., Matsuo S., Degushi M., Ohta M., Nishimura M., Nakamura N. & Yoshikawa T. (2002) Polymorphisms of Interferon- $\gamma$  Gene CA-repeat and Interleukin-10 Promoter Region (-592A/C) in Japanese Type I Diabetes. *Human Immunology*, 63:121-128.

TONEGAWA S. (1983) Somatic Generation of Antibody Diversity. *Nature* 302:575.

TSIMBERIDOU A.M., Thomas D., O'Brien S., Andreeff M., Kurzrock R., Keating M., Albitar M., Kantarjian H. & Giles F. (2002) Recombinant Human Soluble Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor (p75) Fusion Protein Enbrel in patients with refractory hematologic malignancies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 50 (3): 237-242.

- VIGNES C., Chiffolleau E., Brouard S., Douillard P., Coudreuse D., Souillou J.P. & Cuturi M.C. (2000) Anti-TCR Vbeta-Specific DNA Vaccination Prolongs Heart Allograft Survival in Adult Rats. *European Journal of Immunology*, 30(9):2460-4.
- WAHLSTROM J., Gigliotti D., Roquet A., Wigzell H., Eklund A. & Grunewald J. (2001) T cell receptor Vbeta expression in patients with allergic asthma before and after repeated low-dose allergen inhalation. *Clinical Immunology*, 100 (1): 31-39.
- WAN Q., Kita M., Flynn J.C., Panos J.C., Motte R.W., Davies T.F., Giraldo A.A., David C.S. & Kong YC. (2001) Participation of Vbeta13(+) and Vbeta1(+) T cells in transfer thyroiditis after activation of mouse thyroglobulin-primed T cells by superantigen staphylococcal enterotoxin A. *Cellular Immunology*, 213 (2) :149-157 .
- WANG X.Y., Hurme M., Jylhä M. & Hervonem A. (2001) Lack of Association between Human Longevity and Polymorphisms of IL-1 Cluster, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  genes in Finnish Nonagearians. *Mechanisms of ageing and development*, 123: 29-38.
- WU MS., Huang SP., Chang YT., Shun CT., Chang MC., Liu MT., Wang HP. & Lin JT. (2002) Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-10 Promoter Polymorphisms in Epstein-Barr Virus – Associated Gastric Carcinoma. *Journal of Infections Disease*, 185: 106-109.
- YAMADA J., Streilein J. W. & Daí M.R. (1999) Role of Tumor Necrosis Factor Receptors TNFR-I (p55) and TNFR-II (p75) in Corneal Transplantation. *Transplantation*, 68 (7): 944-949.

- YEE L.J., Tang J., Gibson A.W., Kimberly R., van Leeuwen D.J. & Kaslow R.A. (2001) Interleukin 10 Polymorphisms as Predictors of Sustained Response In Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C Infection. *Hepatology*, 33(3): 708-712.
- ZEGGINI E., Thomson W., Alansari A., Ollier W., Donn R. *et al.* (2002) Tumour Necrosis Factor Receptor II Polymorphism and Juvenile Idiopathic Arthritis. *Rheumatology*, 41: 462-465.
- ZHAO T.M., Whitaker S.E. & Robinson M.A. (1994) A Genetically Determined Insertion/deletion Related Polymorphism in Human T Cell Receptor  $\beta$  Chain (TCRB) Includes Functional Variable Gene Segments. *Journal of Experimental Medicine*, 180: 1405-1414.
- ZHENG B., Han S., Zhu Q., Goldsby R. & Kelsoe G. (1996) Alternative Pathways for the Selection of Antigen-Specific Peripheral T Cells. *Nature*, 384 (nov): 263-266.