



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**ESTRUTURA E VARIABILIDADE DO PROMOTOR DO GENE DO FATOR DE
NECROSE TUMORAL HUMANO (*TNF*)**

Aluna: Mariana Paiva Lopes
Orientadora: Profa.Dra. Daniela de Melo e Silva
Co-Orientador: Prof.Dr. Erick da Cruz Castelli

Goiânia, março de 2014



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

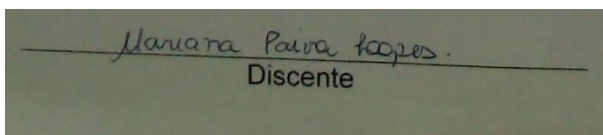
Nome completo do autor: Mariana Paiva Lopes

Título do trabalho: ESTRUTURA E VARIABILIDADE DO PROMOTOR DO GENE DO FATOR DE NECROSE TUMORAL HUMANO (*TNF*).

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Discente

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 10 / 04 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**ESTRUTURA E VARIABILIDADE DO PROMOTOR DO GENE DO FATOR DE
NECROSE TUMORAL HUMANO (*TNF*)**

Mariana Paiva Lopes

Orientadora: Profa.Dra. Daniela de Melo e Silva

Co-Orientador: Prof.Dr. Erick da Cruz Castelli

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular da Universidade Federal de
Goiás como pré-requisito para obtenção do título
de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Goiânia, março de 2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

L864e Lopes, Mariana Paiva.
Estrutura e variabilidade do promotor do gene do Fator de
Necrose Tumoral Humano (*TNF*). [manuscrito] / Mariana
Paiva Lopes. - 2014.
53 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela de Melo e Silva; Co-
orientador: Erick da Cruz Castelli

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Ciências Biológicas, 2014.

Bibliografia.

1. Necrose tumoral 2. Histocompatibilidade I. Título.

CDU: 616-002.42-006



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
Campus II (Samambaia), ICB IV, segundo piso, Goiânia, Goiás.
Tel/fax: 62 3521 1203
Email: posgeneticaufg@gmail.com

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 006

Ata da reunião da banca examinadora da defesa de dissertação em nível de mestrado. Em doze de março de dois mil e quatorze, às quatorze horas, no Miniauditório do ICB IV, Campus II, UFG, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva – ICB/UFG, Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva – PUC/GO e Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares – ICB/UFG** para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“Estrutura e variabilidade do promotor do gene do Fator de Necrose Tumoral Humano (TNF)**, em nível mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Mariana Paiva Lopes**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de.....25..... minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu ao examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº955/26 de fevereiro de 2010 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e procedidas às correções recomendadas, a dissertação foi ~~aprovada~~ ^{aprovada}, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de concentração em pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do programa da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. A banca examinadora recomenda a publicação de artigo (s) científico oriundo (s) dessa dissertação em

UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
 Campus II (Samambaia), ICB IV, segundo piso, Goiânia, Goiás.
 Tel/fax: 62 3521 1203
 Email: posgeneticaufg@gmail.com

29 periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações
 30 sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 horas e um (05) minutos
 31 encerrou-se a sessão de defesa, e para constar eu, Lorena Reis Pinho, Assistente em
 32 Administração - da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata, que após lida e
 33 aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

34
 35
 36
 37 *Daniela de Melo e Silva*
 38 **Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva**
 39 **ICB/UFG**

40
 41
 42
 43 *Cláudio Carlos da Silva*
 44 **Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva**
 45 **PUC/Goiás**

46
 47
 48
 49 *Thannya Nascimento Soares*
 50 **Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares**
 51 **ICB/UFG**

52
UFG
 UNIVERSIDADE
 FEDERAL DE GOIÁS

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus. Aos meus pais pelo imenso amor e dedicação.

À minha orientadora, Prof. Dra. Daniela de Melo e Silva por me acolher, apoiar, incentivar o meu crescimento na pós-graduação e pela paciência durante a sua orientação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Erick da Cruz Castelli, pela oportunidade de ingressar na pós-graduação, pelo voto de confiança, pelo exemplo em pesquisa e pela paciência durante a sua orientação.

Aos meus queridos amigos de laboratório: Andrea, Iane, Kaison, Leandro, Lais, Thállita e Thiago pelo convívio, ao Kaison, e Leandro pelo auxílio nas análises dos dados, e pelos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Paulo César Gedhini, por nos acolher tão bem e nos oferecer um espaço físico dentro do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular.

À Dra. Rosana Pereira Vianello, à Dra. Gesimária Ribeiro Costa Coelho e à Paula Arielli Valdisser, laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA, pelo auxílio com os sequenciamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás e ao seu corpo docente pelos ensinamentos.

Aos membros da banca avaliadora, Professora Daniela de Melo Silva, Professor Cláudio Carlos da Silva e Professora Thannya Nascimento Soares pela participação na banca examinadora e pela avaliação desta dissertação, por se disporem a oferecer seu tempo para contribuírem com a minha formação.

À CAPES por fornecer o apoio financeiro e a bolsa de mestrado. E a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que meu trabalho pudesse ser concluído.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 GENE DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (<i>TNF</i>)	11
1.2 POPULAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDO	17
1.3 CARCINOMA VESICAL	18
1.4 PROJETO <i>1000GENOMES</i>	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS	22
3.2 OBTENÇÃO DOS DADOS MOLECULARES	23
3.2.1 PROCESSAMENTO DO PRODUTO AMPLIFICADO	24
3.2.2 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO	24
3.2.3 ANÁLISE DOS PRODUTOS DO SEQUENCIAMENTO	26
3.3 OBTENÇÃO DOS DADOS PÚBLICOS DO PROJETO <i>1000GENOMES</i>	26
3.4 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	27
3.5 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E INFERÊNCIA COMPUTACIONAL DE HAPLÓTIPOS	27
3.6 TESTE DE NEUTRALIDADE	28
3.7 ANÁLISE DO ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO	29
4 RESULTADOS	29
4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEIBERG	29
4.2 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	33
4.3 DIVERSIDADE, FREQUÊNCIA E RELAÇÕES ENTRE OS HAPLÓTIPOS	34
4.4 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO <i>TNF</i> E O CARCINOMA VESICAL	41
4.4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS	41
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	45
7 REFERÊNCIAS	46

RESUMO

O gene do Fator de Necrose Tumoral (*TNF*) humano está localizado no MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) central, região conhecida como classe III. Este gene codifica uma citocina pró-inflamatória importante, produzida principalmente por macrófagos, que tem sido relacionada com diversas doenças, como as autoimunes e as degenerativas. Estudos indicam que polimorfismos do *TNF* podem influenciar seu nível de expressão e atividade e, portanto, poderiam influenciar a susceptibilidade a tumores. Considerando que o urotélio vesical pode ser constantemente alvo de processos inflamatórios e que as principais formas de tratamento de tumores vesicais são imunoterápicos, o perfil genético de um indivíduo pode influenciar a susceptibilidade a esse tipo de lesão. Neste estudo analisamos a estrutura e a variabilidade da região regulatória do gene *TNF* em amostras brasileiras e os resultados foram comparados com dados obtidos pelo projeto *1000Genomes*. Foi realizado um estudo de associação entre polimorfismos da região promotora do *TNF* e o carcinoma vesical em pacientes do estado de São Paulo da cidade de Ribeirão Preto, nas nossas análises não houve relação dos dados encontrados com o carcinoma vesical. Considerando todas as populações avaliadas foram encontrados 15 pontos de variação, 11 encontrados nas amostras brasileiras e 15 encontrados nos dados do projeto *1000Genomes*, esses pontos de variação estão arranjados em 20 haplótipos diferentes. Esses haplótipos em conjunto com as comparações envolvendo sequências de primatas indicam que um alelo principal surgiu antes da especiação e dispersão humana. Duas linhagens foram definidas pelas relações haplotípicas e são, provavelmente, muito antigas na história evolutiva humana, já que todas as populações avaliadas apresentaram haplótipos pertencentes a cada uma destas linhagens. A frequência do haplótipo H01 é a mais alta entre todas as populações avaliadas. No entanto, o haplótipo H12, embora com frequência reduzida quando comparado com o H01, provavelmente é o haplótipo mais antigo em parte por esta segunda linhagem ser compartilhada com outros primatas.

Palavras-Chave: Complexo Principal de Histocompatibilidade, Fator de Necrose Tumoral, Carcinoma vesical, Desequilíbrio de Ligação, Haplótipos.

ABSTRACT

The gene for tumor necrosis factor (*TNF*) is located in the human MHC central region known as class III (Major Histocompatibility Complex). This gene encodes an important pro-inflammatory cytokine produced primarily by macrophages, and it has been associated with several diseases, such as autoimmune and degenerative ones. Studies indicate that *TNF* polymorphisms may influence their level of expression and activity and therefore could influence susceptibility to tumors. Whereas the bladder urothelium can constantly be the target of inflammatory processes and as the main forms of treatment of bladder tumors are immunotherapy, the genetic profile of an individual can influence susceptibility to this type of injury. In this study, we analyzed the structure and variability of the regulatory region of the *TNF* gene in Brazilian samples and the results were compared with data obtained by *1000Genomes* project. A study of association between polymorphisms of the promoter region of *TNF* and bladder carcinoma patients in the state of São Paulo in Ribeirão Preto, in our analysis was conducted there was no relationship of the data found with bladder carcinoma. In all evaluated populations we found 15 variation points, found in 11 Brazilian and 15 variation points found in the *1000Genomes* data, these variation points are arranged in 20 different haplotypes. These haplotypes with comparisons involving primate sequences indicated that one allele arose before the main speciation and human dispersion. Two strains were defined by haplotype relationships and are probably very old in human evolutionary history, since all populations evaluated showed haplotypes belonging to each of these strains. The frequency of haplotype H01 is the highest among all populations evaluated. However, the haplotype H12, although at reduced frequency compared to H01 is probably the oldest haplotype in part by the second line being shared with other primates.

Keywords: Major Histocompatibility Complex, Tumor Necrosis Factor, bladder carcinoma, Linkage Disequilibrium, Haplotypes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 GENE DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (*TNF*)

O gene que codifica o Fator de Necrose Tumoral (*TNF*) está localizado em 6p21.3, região de classe III do Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano (MHC). Este complexo ocupa 3,6 megabases (Mb) no braço curto do cromossomo 6. O MHC compreende cerca de 230 genes, dos quais 40% estão envolvidos de alguma forma com o sistema imune. Alguns genes deste complexo desempenham papel importante na resposta imune adaptativa e na susceptibilidade a diversas doenças auto-imunes e degenerativas (Klein e Sato, 2000b; a). Uma das principais funções do MHC é proporcionar proteção contra patógenos (Horton *et al.*, 2004). Desses 230 genes, cerca de 26% estão presentes na região central do MHC, MHC central ou MHC de classe III. É nessa região que o gene *TNF* está localizado (Klein e Sato, 2000b; Undlien *et al.*, 2001; Horton *et al.*, 2004) (Figura 1).

O MHC é a região mais polimórfica do genoma humano. Este acentuado polimorfismo está contido principalmente nos genes relacionados com apresentação antigênica. Estes genes apresentam diversos alelos descritos para cada gene e frequências alélicas distintas em cada população já avaliada (Apanius *et al.*, 1997; Hughes e Yeager, 1998; Penn *et al.*, 2002).

Muitos estudos apoiam a hipótese de que essa diversidade alélica no MHC de vertebrados é mantida por meio de seleção balanceadora mediada por microorganismos. Um exemplo é a habilidade dos genes de classe I e II de apresentar antígenos de diversos patógenos devido principalmente à variação contida nos sítios de ligação de peptídeos (Apanius *et al.*, 1997; Hughes e Yeager, 1998; Penn *et al.*, 2002).

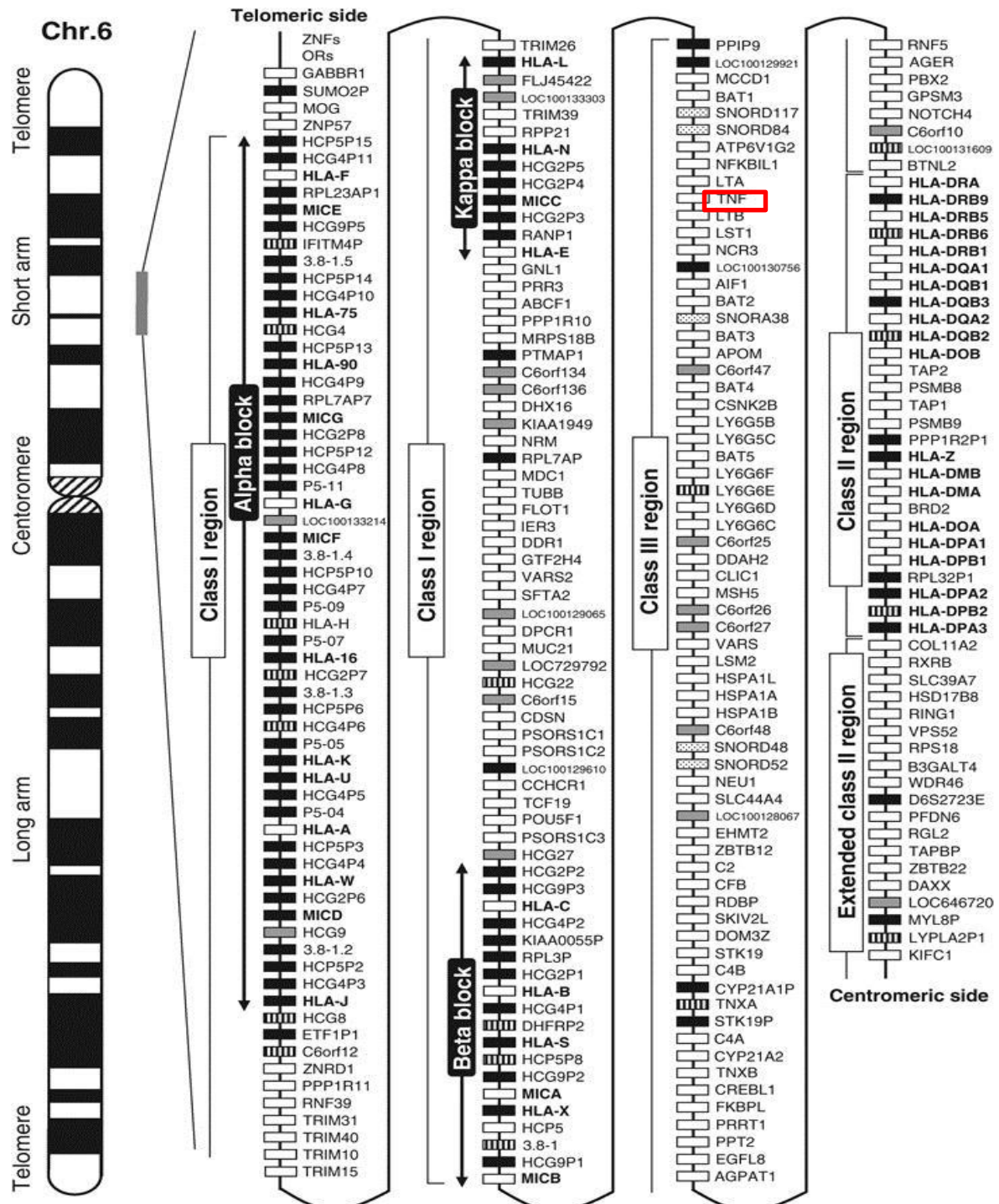


Figura 1. Estrutura da região do MHC humano, representando os genes MHC de classe I, II e III. Em destaque o gene *TNF*, alvo deste estudo. (Shiina *et al.*, 2009).

A seleção que favorece indivíduos heterozigotos para genes do MHC (Doherty e Zinkernagel, 1975), a seleção depende de frequência direcionada por patógenos, e a seleção a favor de alelos raros através da co-evolução entre patógenos e hospedeiro (Clarke e Kirby,

1966) são modelos seletivos que podem explicar a manutenção dos polimorfismos na região do MHC.

Muitos estudos apontam para a vantagem do heterozigoto em genes do MHC (Doherty e Zinkernagel 1975; Hughes e Nei 1988, 1989; Takahata e Nei 1990; Hughes e Nei 1992), uma vez que diferentes moléculas de MHC se ligam a diferentes peptídeos e portanto heterozigotos podem apresentar uma maior variedade de peptídeos. Desta forma, heterozigotos podem se defender contra uma grande variedade de patógenos em comparação com homozigotos (Penn *et al.*, 2002). Por serem necessárias combinações específicas de MHC-peptídeo para desencadear uma resposta imune eficiente, indivíduos heterozigotos em genes do MHC conseguem se defender com maior eficiência de infecções através de respostas imunes efetivas contra uma maior gama de patógenos.

A seleção dependente de frequência também pode ser responsável pelos padrões de diversidade encontrados em genes de moléculas do MHC. Estudos mostram que o grau de polimorfismo do MHC que surge sob a co-evolução patógeno-hospedeiro é maior que a vantagem do heterozigoto, e que é capaz de justificar o alto grau de polimorfismos nessa região do genoma (Borghans *et al.*, 2004).

Estudos a respeito da vantagem do heterozigoto e seleção dependente de frequência na evolução dos polimorfismos do MHC têm sido debatidos por décadas (Lewontin *et al.*, 1978; Hughes e Nei, 1988; Takahata e Nei 1990). Um estudo mais recente mostra que os diferentes modos de seleção do MHC estão operando em sistemas diferentes e em diferentes tempos, e dão origem a um equilíbrio dinâmico com frequências alélicas e haplotípicas flutuantes. Outros fatores, como isolamento geográfico, social e fortes pressões seletivas geradas por, por exemplo, infecções severas, podem influenciar o grau dos polimorfismos do MHC (Hedrick, 2002), o que sugere que os mecanismos para a manutenção dos polimorfismos na região do MHC tendem a ser muito mais complexos do que se pensava anteriormente (Ekblom *et al.*, 2010).

Polimorfismos do MHC humano podem estar associados com diversas doenças, especialmente aquelas com forte componente imunológico, susceptibilidade a infecções, neoplasias e expressão diferencial dos genes do complexo (Deininger & Batzer, 1999; Deghaide *et al.*, 2009). O MHC é uma região que apresenta uma grande quantidade de substituições de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), microsatélites e inserção/deleção (indels) na forma de retroelementos, tais como as inserções Alu (Jongeneel *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 2003; Malkki *et al.*, 2005; Kulski & Dunn, 2005; Deghaide *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF), também encontrado na literatura como TNFA, TNF-a, TNF derivado de monócitos e TNF derivado de macrófagos, é uma citocina pró inflamatória presente em vários tipos de tecidos, porém é predominantemente produzida por fagócitos mononucleares ativados, principalmente macrófagos. O TNF possui capacidade de causar necrose de tumores devido a trombose dos vasos sanguíneos tumorais, daí a origem do seu nome. O gene codificador do *TNF* localiza-se no MHC central, em uma região de alta densidade gênica.

Citocinas são pequenas moléculas protéicas ou peptídicas que estão envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento de respostas inflamatórias ou imunes. Em geral, não ocorre armazenamento de citocinas pré-formadas e a síntese de citocinas é iniciada por novas transcrições dos genes codificadores. As citocinas possuem ações pleiotrópicas, i.e., agem em diferentes tipos celulares, acarretando diferentes efeitos biológicos, e ações redundantes, i.e., várias citocinas têm os mesmos efeitos funcionais (Abbas e Lichtman, 2003a). O principal estímulo para a produção do TNF são os lipopolissacarídeos que compõem a membrana das bactérias gram-negativas. Outros tipos de células, como células NK, mastócitos, células endoteliais, queratinócitos e células da musculatura lisa, também são capazes de induzir a produção desta citocina (Rubin *et al.*, 1986).

O TNF é sintetizado como uma proteína de membrana de 26 quilo-Daltons (kD), que ao ser clivado por uma metaloproteinase (Black *et al.*, 1997), torna-se solúvel em sua forma ativa com 17kD. As moléculas de TNF com 17kD são compostas por 157 aminoácidos e possuem uma ponte dissulfídica ligada a dois resíduos cisteínicos (Shalaby *et al.*, 1986). A molécula é expressa na membrana citoplasmática do macrófago como um trímero de 51 kD, com forma piramidal e cada face é formada por uma subunidade de 17kD (Abbas *et al.*, 2010).

Esses trímeros ligam-se aos dois receptores de membrana de TNF que estão presentes em quase todos os tipos celulares. O receptor TNF tipo I (TNF-RI) e TNF tipo II (TNF-II) são proteínas envolvidas nas respostas imunes e inflamatórias. Quando acionados, induzem a expressão de genes de morte celular. O TNF-RI é o que está mais relacionado com a maioria dos efeitos biológicos do TNF (Vandelabeele *et al.*, 1995).

O TNF possui funções biológicas importantes, como estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para erradicar os microorganismos. Esta citocina possui alvos celulares e efeitos biológicos variados. Por exemplo, o TNF ativa células endoteliais durante os processos inflamatórios e de coagulação; promove a ativação de leucócitos polimorfonucleares; estimula a produção de outras citocinas como interleucina (IL) IL-1, IL-10 e IL-6 e o próprio TNF (O'Shea *et al.*, 2002); aumenta a

expressão das moléculas de MHC de classe I, favorecendo a lise mediada pelos linfócitos; e inibe a replicação de alguns vírus (Abbas e Lichtman, 2003b).

Em alguns momentos em que o estímulo para a produção de TNF é forte, a citocina penetra na corrente sanguínea, tem ação sistêmica, e age em locais distantes como um hormônio endócrino, causa vasodilatação e perda do volume plasmático, porque aumenta a permeabilidade vascular, conduzindo ao choque (Cohen, 2002); no fígado provoca síntese de proteínas de fase aguda do processo inflamatório e do fibrinogênio; no hipotálamo induz a febre, pode causar hipoglicemia, diminuição do tônus vascular e da contração do miocárdio, além de coagulação intravascular disseminada (Abbas, *et al.*, 2010).

O gene *TNF* tem sido relacionado com doenças patogênicas e autoimunes. Esta citocina é o principal mediador da atividade inflamatória em resposta a bactérias gram-negativas e outras infecções microbianas. Quando infecções severas tem complicações esta citocina é a principal responsável. A magnitude da resposta inflamatória é importante. Se por um lado respostas insuficientes resultarão em um baixo número de células imunes efectoras, o que poderia levar a infecções ou até mesmo falha da imunovigilância tumoral, por outro lado respostas excessivas poderão causar morbidade e mortalidade em várias doenças como artrite reumatóide, doença de Crohn, arteriosclerose, diabetes, mal de Alzheimer, esclerose múltipla e isquemia miocárdia e cerebral (Tracey, 2002). Além disso, o TNF regula a resposta imune por indução de expressão gênica e ativação de outros genes, ativação de leucócitos polimorfonucleares e efeitos citotóxicos contra células tumorais (Parks *et al.*, 1994). Estudos indicam que haja um potencial prótumorigênico do TNF em certos tipos de tumor, como câncer de cabeça e pescoço e câncer de ovário (Malik *et al.*, 1989; Honchel *et al.*, 1996). Em altas doses, o TNF atua destruindo a vasculatura tumoral, enquanto que em baixas doses, favorece o crescimento estromal do tumor (Marsh *et al.*, 2003).

De acordo com a sequência genômica NT_007462 (número de acesso do NCBI), o *TNF* apresenta 4 éxons. Considerando-se que não há uma nomenclatura padrão para os polimorfismos deste gene, no presente estudo, adotaremos a sequência NT_007462 como uma referência, considerando a adenina do primeiro ATG traduzido como nucleotídeo +1. Nucleotídeos da região 5' regulatória anteriores ao primeiro ATG traduzido são representados com valores negativos.

A região regulatória desse gene possui alguns pontos de variação importantes, que foram encontrados em outros trabalhos (Tabela 1). Os artigos citados relatam números de posições diferentes, que foram normalizadas neste trabalho conforme o padrão acima proposto. Ainda, a Tabela 1 apresenta o número de acesso para cada ponto de variação descrito.

Tabela 1. Pontos de variação da região promotora do gene *TNF* e suas respectivas referências.

Posição ATG	Posição descrita em artigos	SNP ID	Variação
-1253	-917	rs9282875	C/T
-1211	-1031	rs1799964	T/C
-1043	-1127	rs1800630	C/A
-1037	-857	rs1799724	C/T
-556	-1614	rs147371058	G/A
-488	-308	rs1800629	G/A
-418	-238	rs361525	G/A

Pontos de variação descritos em artigos.

A expressão de *TNF* é regulada de diferentes formas, tanto durante a transcrição como na tradução. Através da análise da sequência promotora do gene foi encontrada uma série de sítios de ligação de fatores de transcrição que apresentam papel importante na transcrição do gene (Xu *et al.*, 2001). A regulação do processo de transcrição do gene *TNF* é importante para evitar os efeitos deletérios de síntese insuficiente ou excessiva de TNF (Abraham *et al.*, 1999).

A produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias como o TNF pode ter dois efeitos, por um lado pode aumentar o poder da resposta imune quando há infecção por um organismo invasor, por outro pode apresentar efeitos deletérios que modificam o controle metabólico (Lin *et al.*, 2005).

Variações genéticas localizadas na região promotora do gene *TNF* nas posições -418(rs361525), -488(rs1800629), -1037(rs1799724), -1211(rs1799964) podem afetar a transcrição e expressão deste gene, apresentando papéis importantes em doenças associadas com níveis elevados de TNF (Wilson *et al.*, 1995; Huizinga *et al.*, 1997; Schaaf *et al.*, 2001; Correa *et al.*, 2005; Lindholm *et al.*, 2008). O alelo A do polimorfismo -488 da região promotora do *TNF* pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de vários tipos de câncer, pois os genótipos contendo esse alelo são frequentes em vários tipos de cânceres (Demeter *et al.*, 1997; Gallagher *et al.*, 1997; Warzocha *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998).

Em um estudo de indivíduos com carcinoma vesical envolvendo o polimorfismo do gene *TNF* na posição -488, foi relatado que o alelo -488A estaria relacionado com progressão tumoral mais acentuada (Castelli, 2007). Ainda, dados apresentados em um trabalho sugerem que o genótipo -1211C (CC) e o haplótipo C / C / T podem conferir risco de câncer de bexiga, além disso, o polimorfismo -1211C reduziu o risco de recorrência após imunoterapia com BCG (Bacillus Calmette-Guérin) (Ahirwar *et al.*, 2008).

O polimorfismo na posição -418 possui a presença de uma guanina que define o alelo comum, a presença de uma adenina define o alelo mutante (Lin *et al.*, 2004; Appoloni *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que o alelo mutante é um potente ativador transcricional quando comparado ao alelo selvagem, pois a presença do alelo A (adenina) aumentou de seis a sete vezes o poder de transcrição de *TNF* (Wilson *et al.*, 1997). Outros pesquisadores também demonstraram essa alteração no processo de transcrição promovida pelo SNP na posição -418 (Kroeger *et al.*, 1997).

Alguns estudos demonstraram associações de polimorfismos deste gene com complicações tóxicas e mortalidade pós-transplante (Bogunia-Kubik *et al.*, 2003; Bettens *et al.*, 2006).

Estudos dos polimorfismos na região promotora do gene *TNF* mostram que a variabilidade dessa região tem um papel importante em várias patologias. No entanto, a variabilidade da região regulatória deste gene foi pouco explorada. O perfil de Desequilíbrio de Ligação (DL) desta região ainda não foi explorado e não se sabe se os alelos que estão relacionados com expressão diferencial do *TNF* estão ligados ou não. O conhecimento da estrutura e variabilidade desta região permitirá um melhor entendimento dos mecanismos regulatórios deste gene tanto em indivíduos saudáveis como em doentes.

1.2 POPULAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDO

A população utilizada neste estudo é uma amostra da população brasileira residente no estado de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto. A população brasileira é uma excelente fonte de estudos, já que esta é uma população heterogênea.

A variabilidade do *TNF* no Brasil foi pouco explorada. Trabalhos anteriores relacionaram polimorfismos deste gene com algumas doenças, como a obesidade (Tonet *et al.*, 2008). O aumento da produção de *TNF* no tecido adiposo está relacionado com um aumento sistêmico de marcadores inflamatórios, moléculas associadas a propagação da resposta imunológica, que se ligam a receptores específicos nas células-alvos, desencadeando vias de transdução de sinal estimulando a expressão gênica (Tonet *et al.*, 2008).

O *TNF* também foi relacionado ao colesteatoma, promovendo a reabsorção óssea por diferentes vias, agindo na diferenciação e na maturação dos osteoclastos e, também, expondo a matriz óssea (Vitale *et al.*, 2007). Da mesma forma, um estudo relacionou níveis de IL-6 e *TNF* no líquido de recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) (Silveira *et al.*, 2003). Recém-nascidos com essa doença apresentaram níveis líquidos de IL-6 e *TNF* mais

elevados que controles, possivelmente devido à produção cerebral do TNF. Como forma de neuroproteção é possível utilizar bloqueadores cerebrais das ações do TNF (Silveira *et al.*, 2003). Embora trabalhos brasileiros tenham relacionado polimorfismos do *TNF* com algumas doenças, todos os estudos direcionaram as análises para polimorfismos conhecidos previamente selecionados e não avaliaram a variabilidade da região promotora do gene *TNF* como um todo.

1.3 CARCINOMA VESICAL

O câncer é resultado de um descontrole nas vias que regulam a proliferação e morte celular. A célula tumoral se desenvolve em função de uma sucessão de eventos mutacionais de origem genética e epigenética (Virani *et al.*, 2012) alterando genes críticos, entre eles aqueles responsáveis pelo controle do ciclo celular.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) divulgou que em 2008 o câncer foi a segunda causa de morte no Brasil. Essa doença é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial e uma das principais causas de morte em crianças e adultos. Estima-se que em 2020 o número de novos casos anuais no Brasil atinja 15 milhões (INCA, 2008).

O carcinoma vesical é a segunda neoplasia mais frequente entre idosos (Tiraboschi *et al.*, 2002). A classificação dos tipos de carcinoma vesical é feita a partir do tipo do tecido invadido e das características das células que sofrem a alteração maligna. Quando a lesão inicia-se nas células glandulares, de secreção, é chamado de adenocarcinoma. O carcinoma de células escamosas afeta as células delgadas e planas. Essas duas formas de carcinoma vesical podem surgir na bexiga também após longo tempo de infecção ou irritação. O principal tipo representa a maior parte dos casos, inicia-se nas células transicionais da bexiga urinária e é chamado de carcinoma de células de transição (origem epitelial) (INCA, 2008).

Mais de 90% dos casos de carcinoma vesical consistem em tumores derivados de células transicionais da bexiga urinária (Tinazzi *et al.*, 2006). Este tipo de lesão é mais comum em pessoas do sexo masculino que do sexo feminino, sua incidência aumenta progressivamente com a idade e acomete pacientes com idade média de 64 anos (Tiraboschi *et al.*, 2002).

O diagnóstico de pacientes com carcinomas de bexiga é feito através de procedimentos invasivos, como cistoscopias e biópsias (Raghavan, 2000). O tumor é classificado como de baixo ou alto grau, a partir das suas características histológicas e anatomo-patológicas. Quando as lesões papilíferas não são invasivas, tem características do epitélio transicional normal e poucas alterações na estrutura celular e nuclear, esses tumores são considerados de baixo grau.

Tumores de alto grau são lesões papilares ou nodulares que exibem muitas anormalidades estruturais e nucleares, além de anaplasia celular (Cotran *et al.*, 1999).

Cerca de 70% dos casos de câncer de bexiga no Brasil são diagnosticados inicialmente como doença superficial. No entanto, essas lesões apresentam alta probabilidade de recorrência, sendo que mais de 80% persistem confinados à mucosa e à submucosa. Ainda, 30% dos casos progridem para tumores infiltrativos (Borden *et al.*, 2005). A progressão para invasão e óbito ocorre em menos de 5% dos casos (Eble *et al.*, 2004; Epstein, 2005). Portanto, existe relação entre o grau tumoral, o estágio, a progressão da doença e a sobrevida do paciente. Quando o estágio da lesão é primária, apresenta relação positiva com a sobrevida dos pacientes (Tiraboschi *et al.*, 2002).

Segundo o INCA a estimativa de novos casos de câncer de bexiga para o ano de 2012 foi de 8.900 indivíduos, sendo 6.210 homens e 2.690 mulheres. A estimativa de número de mortes decorrentes desta lesão para o ano de 2010 foi de 3.167, sendo 2.229 homens e 938 mulheres. A incidência desse tipo de carcinoma está relacionado a hábitos ocupacionais e estilo de vida (INCA, 2008).

O carcinoma vesical é uma doença relacionada a hábitos como, principalmente, o tabagismo (Smith, 1999). Segundo o INCA, o tabagismo é responsável por aproximadamente 66% dos casos novos em homens e 30% em mulheres. Além disso, a exposição ocupacional é responsável por aproximadamente 20% de tumores de bexiga, principalmente exposição industrial às aminas aromáticas (Reznikoff *et al.*, 2000; Epstein, 2005), exposição em longo prazo ao agente imunossupressor ciclofosfamida (Cotran *et al.*, 1999; Berggren *et al.*, 2001) e exposição a borrachas, tinturas, derivados de petróleo e corantes artificiais (Tiraboschi *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de um tumor de bexiga requer a interação de sucessivos eventos cancerígenos, possui várias etapas desde a ativação de genes que estimulam a proliferação celular até a inibição de genes supressores de tumor que regulam o crescimento e a diferenciação celular (Lorenzo, Romero *et al.*, 2003). Ainda, tem relação com a resistência do paciente ao longo da vida, como sua capacidade de imunovigilância tumoral.

Avanços nas técnicas de biologia molecular permitem um melhor entendimento do processo que origina o câncer de bexiga e demonstram o potencial do uso de SNPs como um promissor marcador molecular para detectar um maior risco para o desenvolvimento e progressão do carcinoma de bexiga (Wang *et al.*, 2010).

A imunoterapia promove estimulação do sistema imunológico utilizando substâncias modificadoras da resposta biológica. No tratamento do câncer não invasivo de bexiga a

imunoterapia intravesical com BCG demonstrou grande avanço. Ensaios clínicos comprovaram que esta terapia é a mais eficaz na redução da recorrência e da progressão do tumor, prolongando a sobrevivência desses pacientes. A partir de 1985 foi comprovado, através ensaios clínicos, a eficácia do tratamento do câncer não invasivo de bexiga utilizando o BCG, a terapia com BCG diminui as taxas de recorrência de 29% a 67% (Lamm, 1985; Prescott *et al.*, 1992). As células uroteliais secretam citocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8 e TNF em resposta a essa estimulação micobacteriana (De Reijke *et al.*, 1993; Esuvaranathan *et al.*, 1995). Devido à complexidade do sistema imunológico as respostas induzidas pela BCG são amplas e muito variadas, e ainda estão sendo estudadas.

A expressão do gene *TNF* pode influenciar as respostas imunes contra neoplasias, atuando na progressão da neoplasia e na resposta a tratamentos imunoterápicos (Correa *et al.*, 2005). Dessa forma, considerando que o urotélio vesical pode ser constantemente alvo de processos inflamatórios e que as principais formas de tratamento de tumores vesicais são imunoterápicos, polimorfismos no gene *TNF* podem influenciar drasticamente a susceptibilidade a esse tipo de lesão bem como a resposta a tratamentos imunoterápicos.

1.4 PROJETO 1000GENOMES

O projeto *1000Genomes* (The 1000Genomes Project Consortium, 2010; 2012), lançado em 2008, é um consórcio internacional que avaliou o genoma completo de 1.092 indivíduos oriundos de 14 populações diferentes utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração. Este projeto objetivou criar uma visão detalhada das variações genéticas humanas, com foco principalmente nas variações genômicas de importância médica. A comparação dos dados obtidos em diferentes indivíduos torna-se uma valiosa fonte para estudos de associação e identificação de genes candidatos para diferentes doenças (Harrow *et al.*, 2012), além de fornecer padrões de diversidade gênica em diferentes populações. Esse projeto consiste numa parceria internacional entre a Inglaterra, a China e os Estados Unidos. O Brasil não faz parte desse estudo, em parte porque não ocorreu um consenso entre a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e os idealizadores do projeto. As informações do *1000Genomes* estão disponíveis para a comunidade científica mundial através de bases de dados públicas.

Outros dois consórcios propuseram sequenciar o genoma humano de alguns poucos indivíduos (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter *et al.*, 2001; Venter, 2003; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004), contudo o

sequenciamento em larga escala de diferentes indivíduos pode gerar dados mais completos e complementares.

Nenhum dos projetos de sequenciamento completo do genoma humano analisou a população brasileira, que é uma população de excelente fonte de estudos, tendo em vista que esta constitui uma das populações mais heterogêneas do mundo. Sendo assim, o estudo da variabilidade do gene *TNF* em uma população tão miscigenada como a brasileira, comparados aos dados obtidos pelo projeto *1000Genomes*, pode contribuir para compreensão das relações evolutivas e fornecer dados para esclarecer a relação da região promotora do gene *TNF* com a susceptibilidade ao carcinoma vesical.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo é avaliar a variabilidade e a estrutura da região promotora do gene que codifica o Fator de Necrose Tumoral (*TNF*) em uma amostra da população brasileira do estado de São Paulo, cidade de Ribeirão Preto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a diversidade presente na região promotora do gene *TNF*, em uma amostra da população brasileira do estado de São Paulo;

- Relacionar a variabilidade encontrada com os dados divulgados no projeto *1000Genomes*, que não inclui o Brasil entre as populações avaliadas;
- Identificar os haplótipos existentes na porção avaliada do *TNF* e identificar a relação entre eles;

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de potenciais doadores de medula óssea não-relacionados, oriundos do Hemocentro de Ribeirão Preto - SP. Estas amostras foram utilizadas em estudos prévios que avaliaram a variabilidade de outros genes MHC (Castelli *et al.*, 2009; Castelli *et al.*, 2010; Castelli *et al.*, 2011; Veiga-Castelli *et al.*, 2012b; Santos *et al.*, 2013; Felício *et al.*, 2014). O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (Processo HCRP n 12398/2004). As amostras estudadas constituem um grupo controle de 51 indivíduos sadios e um grupo de 82 pacientes portadores de carcinoma urotelial da bexiga urinária, oriundos do HC de Ribeirão Preto, residentes na região de Ribeirão Preto, estado de São Paulo.

3.2 OBTENÇÃO DOS DADOS MOLECULARES

A variabilidade da região promotora do gene *TNF* foi avaliada pelo sequenciamento direto do produto de amplificação. A região foi escolhida com base em artigos que relatam a importância de pontos de variação nesta região.

Inicialmente, a região promotora do gene *TNF* foi amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando o seguinte par de iniciadores específicos: TNF.F-TGGAGGGAGGGACAGAGGGCT, e TNF.R-CCTCTGCTGTCCTTGCTGAGGGA. Estes iniciadores foram desenvolvidos especificamente para este estudo. Desta forma, foi produzido um fragmento de 1214-pb, compreendendo os nucleotídeos -1359 até -146.

A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L, utilizando-se uma DNA Polimerase denominada Taq Platinum (Invitrogen). Os reagentes utilizados para a PCR foram misturados em tubo separado em quantidades específicas conforme a Tabela 2. Em cada tubo para PCR de 0,2 mL, previamente identificado, foi adicionado 49 μ L da mistura de reagentes e mais 1 μ L de amostra de DNA diluído a 10 ng/ μ L. Em cada reação realizada, um controle negativo contendo apenas os reagentes (sem DNA) foi adicionado para garantir a ausência de contaminação dos componentes da PCR.

Tabela 2. Reagentes e concentrações utilizadas para a amplificação do gene *TNF*.

Componentes da Reação	[] Solução de Uso	1 x (μL)	Concentração Final
Água	-	34,20	-
PCR Buffer – Long	10X	5,00	1,00 X
Sal - MgCl₂	25 mM	3,50	1,75 mM
dNTPs	5 mM	2,00	0,20 mM
Iniciador F – TNF F	10 pM	2,00	0,40 μ M
Iniciador R – TNFR	10 pM	2,00	0,40 μ M
DNA Polimerase – Platinum	5 U	0,30	1,50 U
Volume total	-	49,00	-
Volume de amostra (10 ng/μL)	-	1,00	2 ng/ μ L

A ciclagem de temperaturas utilizada foi: (a) 94° C de desnaturação inicial por 3 minutos, (b) 30 ciclos de 94° C de desnaturação por 30 segundos, 63° C de temperatura de anelamento por 30 segundos, 72° C de temperatura de extensão por 1 minuto e 30 segundos e (c) uma extensão final de 5 minutos a 72° C. O produto de PCR foi armazenado em freezer - 20°C até o momento de sua utilização.

As reações de amplificação foram avaliadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Para cada amostra foi aplicado um volume de 5 µL de produto de PCR junto com 1 µL de tampão de carregamento 6x *Loading Dye*TM (Fermentas – Vilnius, Lituânia). Em cada corrida foi adicionada uma escada alélica *GeneRuler*TM (Fermentas – Vilnius, Lituânia) para conferência do tamanho aproximado dos produtos de amplificação gerados pela reação de PCR, e adicionado o controle negativo como um parâmetro de ausência de contaminação. Em seguida, a corrida eletroforética foi realizada em uma cuba de eletroforese com voltagem fixada em 90 V, durante 45 minutos (10V/cm). Os géis foram expostos à luz ultravioleta (UV) e posteriormente fotografadas em um fotodocumentador.

3.2.1 PROCESSAMENTO DO PRODUTO AMPLIFICADO

O produto amplificado foi purificado com o kit comercial *Illustra*TM *GFX*TM *PCR DNA and gel band purification* (GE HelthCare® - Buckinghamshire, Reino Unido) para eliminação dos resíduos de dNTPs não incorporados, DNA polimerase e outros constituintes da reação de PCR. Logo após, foi realizada a quantificação das amostras com o uso do equipamento *Qubit*[®] *2.0 Fluorometer Quantitation* (Invitrogen - Eugene, Estados Unidos) e normalização à 10ng/µL diluindo-se o amplificado com água ultrapura autoclavada, para a realizações das reações de sequenciamento.

3.2.2 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

Os produtos de amplificação foram sequenciados com o uso do kit de sequenciamento *BigDye*[®] *Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems - Foster City, Estados Unidos) e com os *primers* desenhados para este sequenciamento. Os reagentes foram misturados em quantidades específicas (Tabela 3) em um único tubo para garantir a homogeneidade das reações.

Foram acrescentados 5 µL do produto de PCR purificado e normalizado a 10 ng/µL (totalizando 50 ng de DNA) e 5 µL da mistura de reagentes na placa de 96 poços devidamente

identificada. O programa de ciclagem utilizado foi: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto; 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Para o sequenciamento da região promotora do gene *TNF* foram utilizados 3 diferentes *primers* desenhados especificamente para este trabalho.

TNF.F (5'-TGGAGGGAGGGACAGAGGGCT-3')

TNF.R I (5'-GTCTTCTGGGCCACTGACTG-3')

TNF.R (5'-CCTCTGCTGTCCTTGCTGAGGGA-3')

Tabela 3. Reagentes e concentrações utilizadas na reação de sequenciamento (para uma corrida utilizando um primer específico).

Componentes da Reação	1 x (µL)
Água ultrapura autoclavada	1,25
Tampão <i>BigDye</i> 5X	1,25
<i>Primer</i> (3,2 ng/µL)	1,00
<i>BigDye</i> 3.1	1,50
Volume Total	5,00
Volume de produto de PCR normalizado (10ng/ µL)	5,00

Após o sequenciamento, as reações foram precipitadas utilizando-se protocolo recomendado pela empresa produtora do kit de sequenciamento. Neste protocolo foram utilizados etanol absoluto e ácido etileno diamino tetracético [EDTA] (125 mM), conforme procedimento descrito a seguir: em cada poço da placa foi adicionado 2,5 µL da solução de EDTA e 30 µL de etanol absoluto gelado (freezer -20 por um mínimo de 2 hora). Cobriu-se a placa, selando-a com papel alumínio e homogeneizou-se. A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugada por 30 min a 3000 x g. Logo após, a placa foi vertida e centrifugada por 1 min a 185 x g com papel absorvente para se retirar o álcool do passo inicial de precipitação. Adicionou-se então 30 µL de etanol 70% gelado a cada poço, seguido de centrifugação por 15 min a 1650 x g com uma temperatura de 4°C. Inverteu-se a placa e centrifugou-se por 1 min a 185 x g com papel absorvente para retirar os componentes da segunda rodada de precipitação. Por fim, a placa foi secada em um termociclador com temperatura de 90°C por 1 minuto.

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida Hi-Dy, desnaturadas por 5 minutos a 95°C e posteriormente aplicadas no sequenciador ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) para a leitura do sequenciamento.

3.2.3 ANALISE DOS PRODUTOS DO SEQUENCIAMENTO

A qualidade dos produtos do sequenciamento foi examinada em um primeiro momento visualizando-se os eletroferogramas no programa Chromas® Lite. Posteriormente, os arquivos contendo os eletroferogramas de sequenciamento foram alinhados com a sequência genômica do *TNF* (NT_007462), para fins de referência. A leitura e interpretação dos sequenciamentos e alinhamentos foi realizada manualmente por dois observadores, descartando-se regiões de baixa qualidade (nucleotídeos com valor PHRED inferiores a 20 foram descartadas e posteriormente reavaliadas). Cada SNP detectado foi anotado individualmente e comparado com as variações já descritas para a sequência genômica do *TNF*. Cada SNP teve sua posição correta definida a partir da comparação com a sequência NT_007462, considerando a Adenina do primeiro ATG traduzido como base número +1. As bases analisadas em cada sequenciamento que não apresentaram variação foram definidas como sendo igual à sequência padrão de comparação. Cada ponto de variação detectado foi anotado individualmente para posterior análise.

3.3 OBTENÇÃO DOS DADOS PÚBLICOS DO PROJETO 1000GENOMES

Os dados do projeto 1000Genomes referentes ao gene *TNF* foram obtidos no site oficial do projeto, www.1000genomes.org (The 1000Genomes Project Consortium, 2010; 2012). A região avaliada neste estudo foi filtrada a partir dos arquivos .vcf baixados do site oficial do projeto 1000Genomes e concatenados com os dados obtidos para as amostras brasileiras. O arquivo .vcf resultante foi convertido para o formato GENEPOP e ARLEQUIN usando o programa PGDSpider 2.0.19 (Lischer e Excoffier, 2012).

As frequências alélicas e genotípicas de cada loco foram estimadas por contagem direta. A aderência das frequências genotípicas em relação às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi avaliada pelo teste exato de Guo e Thompson (Guo e Thompson, 1992), utilizando-se o software GenePop® 4.0 (Raymond e Rousset, 1995).

Os haplótipos desse grupo já estavam em fase gamética, a provável constituição de cada um dos cromossomos estava definida, para posterior análise foi feita a comparação entre os resultados das corridas realizadas pelo método PHASE com os dados em fase do *1000Genomes*.

3.4 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

As frequências alélicas de cada loco foram estimadas por contagem direta. A aderência das frequências genótípicas em relação às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi avaliada pelo teste exato de Guo e Thompson (Guo e Thompson, 1992), utilizando-se o software GenePop® 4.0 (Raymond e Rousset, 1995).

3.5 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E INFERÊNCIA COMPUTACIONAL DE HAPLÓTIPOS

A inferência do padrão de desequilíbrio de ligação na região promotora do *TNF* foi realizada usando o programa Haploview® 4.2 (Barrett *et al.*, 2005). As imagens de LD foram geradas pelo Haploview utilizando-se os SNPs com uma frequência alélica mínima (MAF) de 0,01. O padrão de desequilíbrio de ligação foi inferido através do cálculo D' .

O desequilíbrio de ligação foi avaliado nas populações agrupadas da seguinte forma: a) população mundial, dados de todas as populações avaliadas no projeto *1000genomes* e os dados das amostras brasileiras; b) brasileiros, amostras de Ribeirão Preto, estado São Paulo; c) americanos, população residente em Los Angeles (CA) incluindo aqueles com ancestralidade mexicana, porto-riquenhos e colombianos de Medellín; d) europeus, incluindo residentes de Utah com ancestrais do norte e oeste da Europa, Toscana na Itália, britânicos da Inglaterra e Escócia, finlandeses e populações ibéricas na Espanha; e) africanos, população da Nigéria, Quênia, e afrodescendentes americanos no sudoeste dos EUA; f) asiáticos, chineses da população Han em Pequim e população Han do sul da China, e a população japonesa de Tóquio.

Este estudo avaliou o padrão encontrado na análise das diferentes populações mundiais e comparou com os dados e padrões obtidos para a população brasileira, por esse motivo a população brasileira não foi incluída no grupo de americanos.

Dada a associação positiva do desequilíbrio de ligação entre os pontos de variação encontrados, mas a fase de ligação entre cada um destas variantes desconhecida, foi realizada uma inferência computacional dos haplótipos definindo-se a provável constituição de cada um dos cromossomos dos indivíduos analisados.

Para a inferência dos haplótipos, o método computacional empregado foi o *software* PHASE v2 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens e Donnelly, 2003) que implementa um método Bayesiano para reconstrução do haplótipo mais provável. Foram realizadas 10 corridas independentes e os resultados foram então comparados entre si através de um script em Perl denominado HaploRunner (desenvolvido por E. C. Castelli – disponível em <http://castelli-lab.net>), versão 1.1b. Este script executou as 10 corridas independentes e comparou os resultados obtidos em todas as corridas. As inferências de haplótipos que atenderam a dois requisitos foram aceitas: a) tiveram probabilidade de inferência superior a 90%; b) obtiveram o mesmo haplótipo inferido em todas as corridas. Para o método PHASE foram utilizados os parâmetros: number of iterations: 1000; thinning interval: 1; burn-in value: 1000 e valores seed diferentes para cada corrida, conforme descrito em um trabalho prévio (Castelli *et al.*, 2011).

Os haplótipos foram inferidos na população global (população brasileira e do *1000Genomes*), pois os métodos computacionais são probabilísticos e quanto maior o número amostral mais confiabilidade terá a inferência dos haplótipos.

Após a inferência dos haplótipos, estes dados foram convertidos em um formato de texto plano compatível com o *software* Network 4.6.1.1 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) para elaboração de uma rede de interação envolvendo os haplótipos inferidos. A análise foi feita incluindo sequências de um haplótipo frequente de chipanzé (*Pan troglodytes*) (NC_006473), gorila (*Gorilla gorilla*) (NC_018430) e orangotango (*Pongo abelii*) (NC_012597) para comparar o padrão de haplótipos MHC-TNF com o *Homo sapiens*. Foram inseridos os pontos de variação -905 (gorila) e -349 (orangotango) para evitar sobreposição dos haplótipos primatas com os haplótipos humanos, estes pontos foram baseados no alinhamento entre as sequências depositadas no Genbank.

As imagens geradas pelo *software* foram tratadas e reconstruídas utilizando-se programas de edição de imagem.

3.6 TESTE DE NEUTRALIDADE

Para verificar se forças evolutivas estão agindo sobre a variabilidade haplotípica foi feito o teste de neutralidade D de Tajima, que propôs que as diferenças entre o número médio de diferenças entre nucleotídeos (π) e o número de sítios polimórficos pode ser utilizado para testar o modelo neutralista de evolução molecular (Kimura, 1983). Os dados de desvio da neutralidade foram analisados em cada população separadamente pois efeitos demográficos podem

influenciar análise de Tajima, assim como *singletons* também podem levar a Tajimas negativos, pois causam excesso de haplótipos raros. Dessa forma o D de Tajima foi calculado considerando janelas de 500 nucleotídeos, avançando de 25 em 25 nucleotídeos.

3.7 ANÁLISE DO ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

Após as análises dos sequenciamentos da população brasileira foi realizada a análise entre os dados do grupo controle de 51 indivíduos sadios e o grupo de 82 pacientes portadores de carcinoma urotelial da bexiga urinária. As análises do estudo de associação foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad InStat*, versão 3.00. A análise foi feita em cada ponto de variação separadamente utilizando-se o teste exato de Fisher e o cálculo da Odds Ratio (OR), com intervalo de confiança 95% (IC 95%). Admitiu-se erro alfa de 5%, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEIBERG

Nas amostras brasileiras foram encontrados 11 pontos de variação nas posições -1211, -1184, -1043, -1037, -986, -826, -752, -556, -488, -424, -418. Todos os pontos de variação encontrados e as suas frequências são apresentados na Tabela 4.

Nas amostras do projeto *1000Genomes*, 15 pontos de variação foram encontrados em uma ou mais populações mundiais. Destes, 11 também estavam presentes no Brasil e 4 pontos de variação estavam presentes somente nas amostras do *1000Genomes*. Das variações encontradas exclusivamente nas populações avaliadas pelo *1000Genomes*, duas apresentaram frequências superiores a 1% em pelo menos uma das populações, nas posições -1253 e -257.

Considerando somente os dados do projeto *1000Genomes* e a baixa cobertura do sequenciamento realizada pelo consórcio, alguns pontos de variação encontrados em somente um dos 1.092 indivíduos poderiam ser considerados como erros de genotipagem. Nos dados apresentados na tabela 4, os pontos de variação que ocorreram nas posições -1259 e -425 podem ser considerados *singletons*, i.e., variações de ocorrência única.

Tabela 4. Pontos de variação do gene *TNF* e suas frequências em diferentes populações do projeto *1000Genomes* e em uma amostra brasileira de Ribeirão Preto, São Paulo.

					Europa					Ásia			África			América				
Populações				BRA	CEU	TSI	GBR	FIN	IBS	CHB	JPT	CHS	YRI	LWK	ASW	PUR	CLM	MXL	GLOBAL	
				n ^c	133	85	98	89	93	14	97	89	100	88	97	61	55	60	66	1225
Posição ATG ^a	SNP ID ^b	Variação	Alelo ^d	Frequência Alélica																
-1259 ^e	rs189204464	T/C	T	1,0000	0,9941	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
-1253	rs9282875	C/T	C	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9773	0,9948	0,9918	1,0000	0,9833	0,9924	0,9960	
-1211	rs1799964	T/C	T	0,7782	0,7882	0,7602	0,7528	0,8118	0,9286	0,7784	0,8652	0,8000	0,8523	0,8144	0,8361	0,7455	0,8250	0,7273	0,7970	
-1184	rs143866632	C/T	C	0,9887	1,0000	0,9949	0,9944	1,0000	0,9643	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9980	
-1043	rs1800630	C/A	C	0,8647	0,8471	0,8367	0,8483	0,8548	0,9643	0,8144	0,8764	0,8400	0,8636	0,9021	0,8934	0,8000	0,8833	0,8333	0,8560	
-1037	rs1799724	C/T	C	0,8872	0,9412	0,8827	0,9326	0,9355	0,8571	0,8505	0,8315	0,9150	0,9830	0,9897	0,9508	0,9000	0,8000	0,7803	0,9010	
-986	rs4248158	C/T	C	0,9887	0,9882	0,9949	0,9888	0,9892	1,0000	0,9639	1,0000	0,9750	1,0000	1,0000	1,0000	0,9636	1,0000	0,9848	0,9890	
-826	rs140433197	G/A	G	0,9924	1,0000	0,9745	0,9944	0,9892	1,0000	0,9794	0,9888	0,9900	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9930	
-752	rs146630458	A/C	A	0,9848	0,9882	0,9898	0,9888	0,9946	1,0000	0,9639	0,9775	0,9700	1,0000	1,0000	0,9836	1,0000	0,9917	1,0000	0,9870	
-556	rs147371058	G/A	G	0,9586	0,9941	0,9643	0,9944	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9897	0,9754	0,9636	0,9583	0,9545	0,9840	
-488	rs1800629	G/A	G	0,9237	0,8820	0,9031	0,8820	0,871	0,8214	0,9072	0,9775	0,9500	0,8864	0,9021	0,9344	0,8818	0,9417	0,9545	0,9070	
-425 ^e	rs181617089	C/T	C	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9950	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
-424	rs673	G/A	G	0,9924	1,0000	0,9949	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9148	0,9278	0,9508	0,9909	0,9917	1,0000	0,9840	
-418	rs139679880	G/A	G	0,9313	0,9412	0,9235	0,9045	0,9570	0,9643	0,9639	0,9888	0,9600	1,0000	0,9485	0,9508	0,9455	0,9417	0,8939	0,9470	
-257	rs41297589	T/A	T	1,0000	1,0000	0,9898	1,0000	1,0000	1,0000	0,9845	1,0000	0,9950	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9980	

BRA: Brasileiros em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil; **CEU:** Residentes de Utah com ancestrais do norte e oeste da Europa; **TSI:** Residentes da Toscana na Itália; **GBR:** Britânicos da Inglaterra e Escócia; **FIN:** Finlandeses da Finlândia; **IBS:** População Ibérica na Espanha; **CHB:** População Han em Pequim, China; **JPT:** Japoneses em Tóquio; **CHS:** População Han do sul da China; **YRI:** Yoruba em Ibadan, Nigéria; **LWK:** Luhya em Webuye, Quênia; **ASW:** Afrodescendentes americanos no sudoeste dos EUA; **MXL:** Residentes de Los Angeles, Califórnia com ancestrais mexicanos; **PUR:** Porto-riquenhos; **CLM:** Colombianos de Medellín.

a As posições referem-se à Adenina do primeiro ATG traduzido como nucleotídeo +1. b SNP ID foram retirados da lista do Projeto 1000genomes. c Número de indivíduos. d Alelo com maior frequência. e Singletons encontrados no projeto 1000Genomes.

As frequências genotípicas aderiram ao esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os marcadores ($P > 0,05$). Não foram detectados desvios para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras brasileiras (Tabela 5).

Tabela 5. Aderência das frequências do genótipos ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando as populações do projeto *1000Genomes* e a população brasileira ($P \leq 0.05$ indica fuga do equilíbrio).

		Europa					Ásia			África			América		
Populações	BRA	CEU	TSI	GBR	FIN	IBS	CHB	JPT	CHS	YRI	LWK	ASW	PUR	CLM	MXL
Locos		P value													
-1253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0000	-	-	-	1,0000	-
-1211	0,4497	0,1042	0,0897	0,0857	0,7298	1,0000	0,5535	0,6529	1,0000	1,0000	1,0000	0,6432	0,0884	0,6737	0,5379
-1184	1,0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-1043	0,2592	0,2009	0,7185	1,0000	0,3975		0,5165	0,6127	0,2719	0,6528	0,5919	1,0000	0,4227	1,0000	1,0000
-1037	0,6704	1,0000	0,3509	0,3244	1,0000	1,0000	0,4378	0,7082	0,5226	1,0000	1,0000	0,1227	1,0000	1,0000	0,1613
-986	1,0000	1,0000	-	1,0000	1,0000	-	1,0000	-	1,0000	-	-	-	1,0000	-	1,0000
-826	1,0000	-	1,0000	-	1,0000	-	1,0000	1,0000	1,0000	-	-	-	-	-	-
-752	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	-	-	1,0000	1,0000	1,0000	-	-	1,0000	-	-	-
-556	1,0000	-	1,0000	-	-	-	-	-	-	-	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
-488	1,0000	0,5028	0,5925	0,0947	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5921	1,0000	0,1440	1,0000	1,0000
-424	1,0000	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0000	1,0000	0,1233	-	-	-
-418	1,0000	1,0000	0,4413	1,0000	1,0000		0,1035	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
-257	-	-	1,0000	-	-	-	1,0000	-	-	-	-	-	-	-	-

BRA: Brasileiros em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil; **CEU:** Residentes de Utah com ancestrais do norte e oeste da Europa; **TSI:** Residentes da Toscana na Itália; **GBR:** Britânicos da Inglaterra e Escócia; **FIN:** Finlandeses da Finlândia; **IBS:** População Ibérica na Espanha; **CHB:** População Han em Pequim, China; **JPT:** Japoneses em Tóquio; **CHS:** População Han do sul da China; **YRI:** Yoruba em Ibadan, Nigéria; **LWK:** Luhya em Webuye, Quênia; **ASW:** Afrodescendentes americanos no sudoeste dos EUA; **MXL:** Residentes de Los Angeles, Califórnia com ancestrais mexicanos; **PUR:** Porto-riquenhos; **CLM:** Colombianos de Medellín.

- O teste não pôde ser realizado devido à baixa variabilidade ou a presença de somente um alelo nesta população.

4.2 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O Desequilíbrio de Ligação (LD), foi mensurado utilizando o software Haploview 4.1 (Barrett *et al.*, 2005) utilizando pontos de variação que apresentaram frequência alélica mínima (MAF) de 1%. Na população global (união das populações do *1000Genomes* e Brasil), um único bloco de LD foi detectado envolvendo toda a extensão da promotora do gene *TNF*. Em relação aos subgrupos estratificados pelo continente de origem, foi detectado um elevado LD entre o polimorfismo -1211 e os demais polimorfismos (Figura 2).

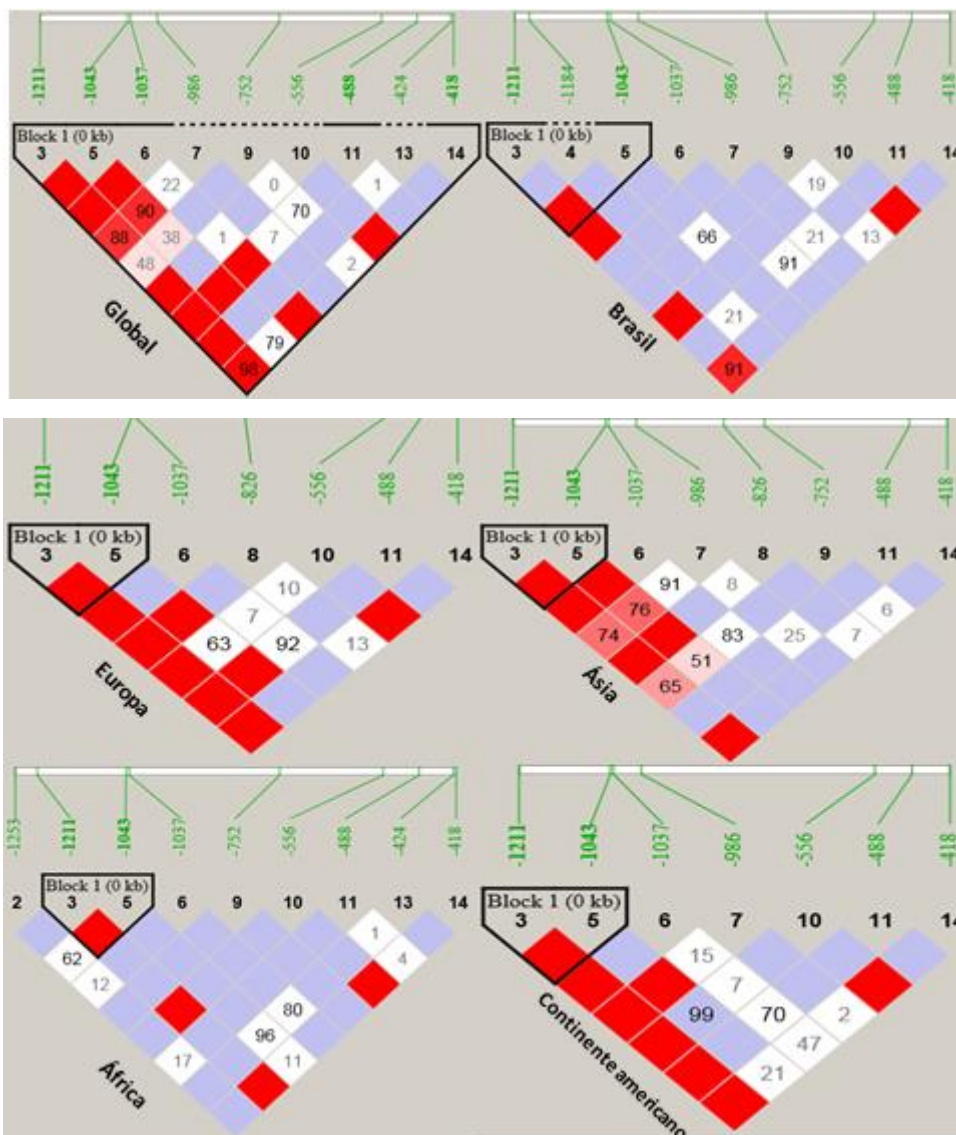


Figura 2. LD entre os pares de SNPs no gene *TNF*. A imagem foi gerada pelo programa Haploview usando SNPs com frequência $\geq 1\%$. Áreas em vermelho indicam forte LD ($\text{LOD} \geq 2$, $D' = 1$), rosa indicam LD moderado ($\text{LOD} \geq 2$, $D' \leq 1$), azul indica LD fraco ($\text{LOD} \leq 2$, $D' \leq 1$) e branco indica que não há LD ($\text{LOD} \leq 2$, $D' \leq 1$). Os blocos de haplótipos foram definidos pelo método de intervalos de confiança implementado no software Haploview. Diferentes valores de D' são representados dentro dos quadrados como percentagens. LOD log das probabilidades; D' , correlação par a par entre os SNPs. Posições de SNPs foram estimados considerando a adenina no primeiro ATG como uma base +1.

4.3 DIVERSIDADE, FREQUÊNCIA E RELAÇÕES ENTRE OS HAPLÓTIPOS

Os haplótipos foram inferidos pelo método probabilístico PHASE como descrito anteriormente. A inferência de haplótipos foi realizada usando 1.225 amostras (1.092 amostras do projeto *1000Genomes* e 133 amostras brasileiras). A análise revelou a presença de 20 haplótipos diferentes considerando os 15 pontos de variação encontrados. As frequências haplotípicas variaram de 0,0004% a 57,22%. A Tabela 6 apresenta os haplótipos encontrados considerando todas as populações em conjunto. A Tabela 7 apresenta a frequência relativa dos 20 haplótipos encontrados nos dados do projeto *1000Genomes* e nas amostras brasileiras.

Tabela 6. Haplótipos encontrados considerando os pontos de variação presentes na região promotora do gene *TNF*.

Haplótipos	Pontos de variação															População mundial
	-1259	-1253	-1211	-1184	-1043	-1037	-986	-826	-752	-556	-488	-425	-424	-418	-257	
H01	T	C	T	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	G	T	0,5722
H02	T	C	T	C	C	C	C	G	A	G	G	C	A	G	T	0,0163
H03	T	T	T	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	G	T	0,0036
H04	T	C	T	T	C	C	C	G	A	G	G	C	G	G	T	0,0024
H05	T	C	T	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	G	A	0,0024
H06	T	C	T	C	C	C	C	G	A	G	G	T	G	G	T	0,0004
H07	C	C	T	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	G	T	0,0004
H08	T	C	T	C	C	T	C	G	A	G	G	C	G	G	T	0,0979
H09	T	C	T	C	C	C	C	G	C	G	G	C	G	G	T	0,0065
H10	T	C	T	C	C	C	C	G	A	G	A	C	G	G	T	0,0926
H11	T	C	T	C	C	C	T	G	A	G	A	C	G	G	T	0,0008
H12	T	C	C	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	G	T	0,0057
H13	T	C	C	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	A	T	0,0367
H15	T	C	C	C	C	C	C	G	A	A	G	C	G	A	T	0,0163
H14	T	C	C	C	A	C	C	G	A	G	G	C	G	G	T	0,1208
H16	T	C	C	C	A	C	T	G	A	G	G	C	G	G	T	0,0106
H17	T	C	C	C	A	C	C	A	A	G	G	C	G	G	T	0,0073
H18	T	C	C	C	A	C	C	G	C	G	G	C	G	G	T	0,0053
Possíveis Crossing																
H19	T	C	T	C	C	T	C	G	C	G	G	C	G	G	T	0,0008
H20	T	C	T	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	A	T	0,0004
Primatas																
<i>Pan troglodytes</i>	T	C	A	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	G	T	-
<i>Gorilla gorilla</i>	T	C	C	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	G	T	-
<i>Pongo abelii</i>	T	C	C	C	C	C	C	G	A	G	G	C	G	G	T	-

– indica que apenas uma sequência de um único indivíduo foi utilizada.

Tabela 7. Frequência relativa dos 20 haplótipos encontrados para o gene *TNF* dos dados do projeto *1000Genomes* e das amostras brasileiras.

			Europa					Ásia			África			América			Populaçã o mundial
BRA			CEU	TSI	GBR	FIN	IBS	CHB	JPT	CHS	YRI	LWK	ASW	MXL	PUR	CLM	
Haplótipos	2n	266	168	196	178	184	28	190	174	194	174	178	118	124	106	118	2450
H01		0,5560	0,5118	0,5153	0,5562	0,6129	0,5714	0,5052	0,6629	0,6500	0,6136	0,6289	0,6475	0,4545	0,5182	0,5417	0,5722
H02		0,0070	0	0,0051	0	0	0	0	0	0	0,0852	0,0722	0,0492	0	0,0091	0,0083	0,0163
H03		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0227	0,0052	0,0082	0,0076	0	0,0167	0,0036
H04		0,0113	0	0,0051	0	0	0,0357	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0024
H05		0	0	0,0102	0	0	0	0,0155	0	0,0050	0	0	0	0	0	0	0,0024
H06		0	0	0	0	0	0	0	0	0,0050	0	0	0	0	0	0	0,0004
H07		0	0,0059	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0004
H08		0,1120	0,0588	0,1173	0,0674	0,0645	0,1429	0,1443	0,1629	0,0850	0,0170	0,0103	0,0492	0,2197	0,1000	0,2000	0,0979
H09		0,0075	0,0118	0,0102	0,0056	0,0054	0	0,0155	0,0112	0,0050	0	0	0,0164	0	0	0	0,0065
H10		0,0780	0,2000	0,0969	0,1180	0,1290	0,1786	0,0825	0,0225	0,0500	0,1136	0,0979	0,0656	0,0455	0,1182	0,0583	0,0926
H11		0	0	0	0	0	0	0,0103	0	0,0050	0	0	0	0	0	0	0,0008
H12		0,0150	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0114	0,0361	0,0082	0	0	0	0,0057
H13		0,0300	0,0529	0,0408	0,0899	0,0430	0,0357	0,0361	0,0112	0,0400	0	0,0412	0,0246	0,0606	0,0182	0,0167	0,0367
H14		0,1090	0,1412	0,1327	0,1292	0,1237	0,0357	0,1237	0,1067	0,1000	0,1364	0,0979	0,1066	0,1515	0,1636	0,1083	0,1208
H15		0,0410	0,0059	0,0357	0,0056	0	0	0	0	0	0	0,0103	0,0246	0,0455	0,0364	0,0417	0,0163
H16		0,0113	0,0118	0,0051	0,0112	0,0108	0	0,0258	0	0,0250	0	0	0	0,0152	0,0364	0	0,0106
H17		0,0075	0	0,0255	0,0056	0,0108	0	0,0206	0,0112	0,0100	0	0	0	0	0	0	0,0073
H18		0,0075	0	0	0	0	0	0,0155	0,0056	0,0250			0	0	0	0,0083	0,0053
H19		0	0	0	0	0	0	0,0052	0,0056	0	0	0	0	0	0	0	0,0008
H20		0,0038	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0004

BRA: Brasileiros em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil; **CEU:** Residentes de Utah com ancestrais do norte e oeste da Europa; **TSI:** Residentes da Toscana na Itália; **GBR:** Britânicos da Inglaterra e Escócia; **FIN:** Finlandeses da Finlândia; **IBS:** População Ibérica na Espanha; **CHB:** População Han em Pequim, China; **JPT:** Japoneses em Tóquio; **CHS:** População Han do sul da China; **YRI:** Yoruba em Ibadan, Nigéria; **LWK:** Luhya em Webuye, Quênia; **ASW:** Afrodescendentes americanos no sudoeste dos EUA; **MXL:** Residentes de Los Angeles, Califórnia com ancestrais mexicanos; **PUR:** Porto-riquenhos; **CLM:** Colombianos de Medellín.

As relações entre os haplótipos obtidos foram inferidas construindo-se uma *network* para avaliar a similaridade entre estes haplótipos e então concatená-los em grupos relacionados, utilizando o algoritmo *median joining* implementado no programa Network® 4.6.1.1 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenetwork.htm>). As imagens geradas pelo software foram reconstruídas utilizando-se programa de edição vetorial.

O haplótipo H01 é o mais frequentemente encontrado em todas as populações avaliadas, seguido do H14 (Tabela 7). A população brasileira foi a que apresentou o maior número de haplótipos, sendo um deles exclusivo do Brasil (haplótipo H20).

A sequência de cada haplótipo *TNF* (Tabela 6) e a *network* construída (Figura 4) definiram duas linhagens de haplótipos do promotor do *TNF* ilustradas com cores diferentes. A primeira linhagem apresenta o haplótipo frequente H01 e seus derivados, todos portando o alelo -1211T. A segunda linhagem apresenta o haplótipo H12 e seus derivados, todos portando o alelo -1211C. Esta segunda linhagem é compartilhada com outros primatas.

Na análise dos dados de desvio da neutralidade (Tabela 8) notou-se que os valores de D de Tajima calculados foram em geral negativos para a maioria das janelas. Em algumas populações, todos os valores calculados foram negativos.

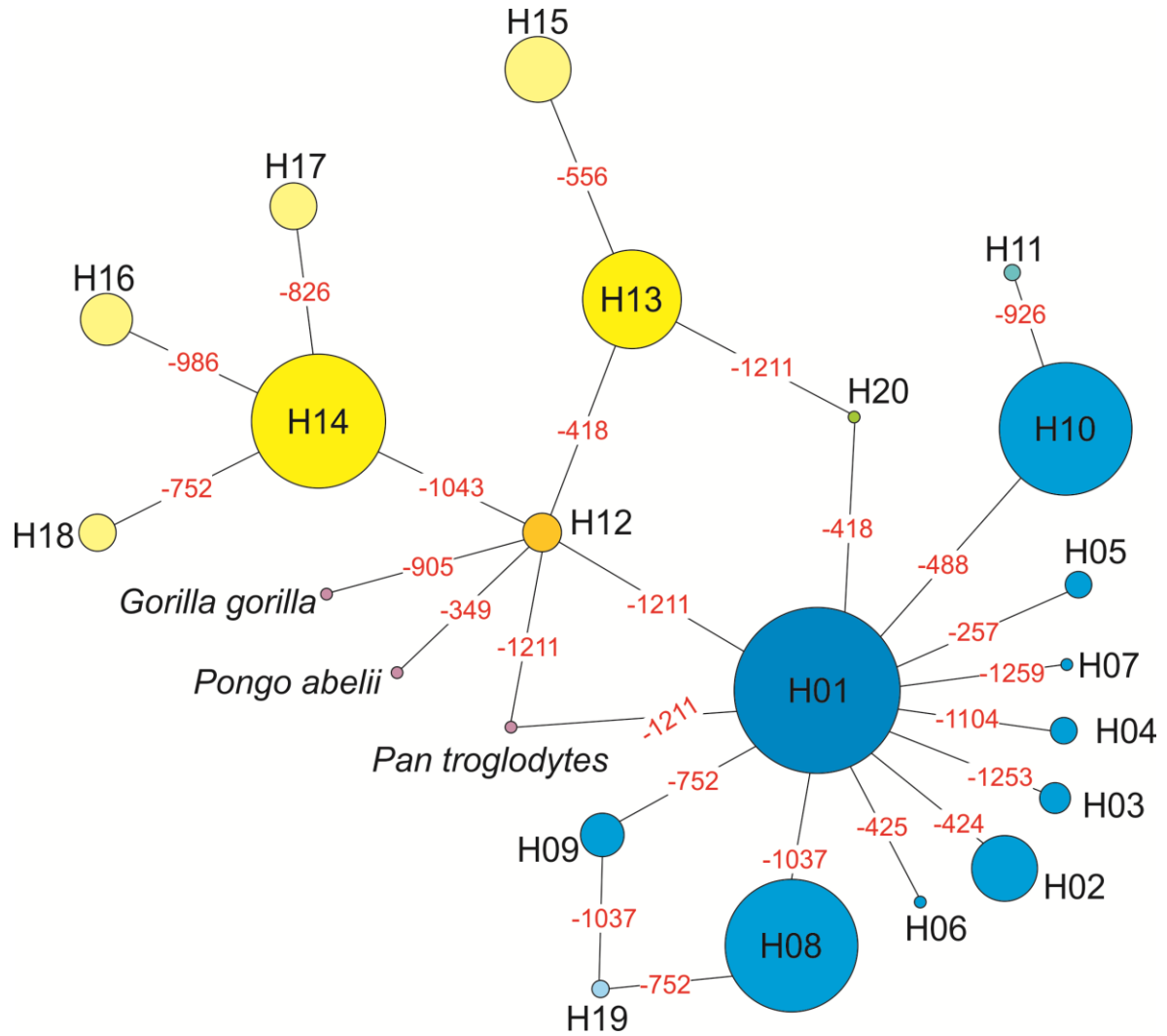


Figura 4. Rede de haplótipos ilustrando as relações entre os 20 haplótipos (Tabela 6) encontrados em populações mundiais. A rede de haplótipos foi calculada utilizando-se o algoritmo *median joining* pelo software Network 4.6.1.1.

Tabela 8. Teste de neutralidade D de Tajima.

Janela	Posição	ASW	BRA	CEU	CHB	CHS	CLM	FIN	GBR	IBS	JPT	LWK	MXL	PUR	TSI	YRI	Global
1	-1340 a -840	-0,4250	0,0347	0,0798	0,7609	0,3030	0,2798	0,0256	-0,1695	-1,2562	0,6669	-0,4499	0,3422	0,5137	0,0347	-0,3325	0,14822
2	-1315 a -815	-0,4250	-0,2656	0,0798	0,3623	-0,0774	0,2798	-0,3173	-0,4710	-1,2562	0,1608	-0,4499	0,3422	0,5137	-0,2095	-0,3325	-0,07444
3	-1290 a -790	-0,4250	-0,2656	0,0798	0,3623	-0,0774	0,2798	-0,3173	-0,4710	-1,2562	0,1608	-0,4499	0,3422	0,5137	-0,2095	-0,3325	-0,07444
4	-1265 a -765	-0,4250	-0,2656	0,0798	0,3623	-0,0774	0,2798	-0,3173	-0,4710	-1,2562	0,1608	-0,4499	0,3422	0,5137	-0,2095	-0,3325	-0,07444
5	-1240 a -740	-0,3834	-0,4778	-0,2712	0,1186	-0,2905	0,2376	-0,6003	-0,6908	-1,2562	-0,1521	-0,0361	0,8319	0,5137	-0,4561	0,0051	-0,03929
6	-1215 a -715	-0,3834	-0,4778	-0,2712	0,1186	-0,2905	0,2376	-0,6003	-0,6908	-1,2562	-0,1521	-0,0361	0,8319	0,5137	-0,4561	0,0051	-0,03929
7	-1190 a -690	-0,7427	-0,9023	-0,7325	-0,2609	-0,6701	-0,0387	-0,9834	-1,1675	-1,1649	-0,3350	-0,5779	0,3285	0,0198	-0,8971	-0,3103	-0,49329
8	-1165 a -665	-0,7427	-0,7029	-0,7325	-0,2609	-0,6701	-0,0387	-0,9834	-0,9592	-0,7675	-0,3350	-0,5779	0,3285	0,0198	-0,6551	-0,3103	-0,27133
9	-1140 a -640	-0,7427	-0,7029	-0,7325	-0,2609	-0,6701	-0,0387	-0,9834	-0,9592	-0,7675	-0,3350	-0,5779	0,3285	0,0198	-0,6551	-0,3103	-0,27133
10	-1115 a -615	-0,7427	-0,7029	-0,7325	-0,2609	-0,6701	-0,0387	-0,9834	-0,9592	-0,7675	-0,3350	-0,5779	0,3285	0,0198	-0,6551	-0,3103	-0,27133
11	-1090 a -590	-0,7427	-0,7029	-0,7325	-0,2609	-0,6701	-0,0387	-0,9834	-0,9592	-0,7675	-0,3350	-0,5779	0,3285	0,0198	-0,6551	-0,3103	-0,27133
12	-1065 a -565	-0,7427	-0,7029	-0,7325	-0,2609	-0,6701	-0,0387	-0,9834	-0,9592	-0,7675	-0,3350	-0,5779	0,3285	0,0198	-0,6551	-0,3103	-0,27133
13	-1040 a -540	-1,1888	-1,0563	-1,3796	-0,6488	-1,0379	-0,4340	-1,3417	-1,5147	-0,0187	-0,5407	-1,2074	-0,2701	-0,7623	-1,1174	-0,8331	-0,80288
14	-1015 a -515	-1,1598	-1,3246	-1,4592	-1,0440	-1,2028	-1,0992	-1,4522	-1,6343	0,0000	-1,1243	-0,8947	-0,9931	-0,9470	-1,3933	0,0000	-1,09026
15	-990 a -490	-1,1598	-1,3246	-1,4592	-1,0440	-1,2028	-1,0992	-1,4522	-1,6343	0,0000	-1,1243	-0,8947	-0,9931	-0,9470	-1,3933	0,0000	-1,09026
16	-965 a -465	-1,0979	-0,9990	-0,5262	-0,7327	-1,0570	-1,0920	-0,8114	-1,1476	0,2933	-1,2843	-0,5779	-0,7643	-0,3911	-0,9605	0,1693	-0,67195
17	-940 a -440	-1,0979	-0,9990	-0,5262	-0,7327	-1,0570	-1,0920	-0,8114	-1,1476	0,2933	-1,2843	-0,5779	-0,7643	-0,3911	-0,9605	0,1693	-0,67195
18	-915 a -415	-1,1904	-1,1042	-0,6035	-0,8742	-1,1233	-1,3238	-0,9090	-0,9891	-0,5629	-1,4627	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-1,1071	0,0451	-0,7516
19	-890 a -390	-1,1904	-1,1042	-0,6035	-0,8742	-1,1233	-1,3238	-0,9090	-0,9891	-0,5629	-1,4627	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-1,1071	0,0451	-0,7516
20	-865 a -365	-1,1904	-1,1042	-0,6035	-0,8742	-1,1233	-1,3238	-0,9090	-0,9891	-0,5629	-1,4627	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-1,1071	0,0451	-0,7516
21	-840 a -340	-1,1904	-1,1042	-0,6035	-0,8742	-1,1233	-1,3238	-0,9090	-0,9891	-0,5629	-1,4627	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-1,1071	0,0451	-0,7516
22	-815 a -315	-1,1904	-0,9145	-0,6035	-0,6408	-0,8773	-1,3238	-0,6192	-0,7245	-0,5629	-1,2843	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-0,9827	0,0451	-0,58586
23	-790 a -290	-1,1904	-0,9145	-0,6035	-0,6408	-0,8773	-1,3238	-0,6192	-0,7245	-0,5629	-1,2843	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-0,9827	0,0451	-0,58586
24	-765 a -265	-1,1904	-0,9145	-0,6035	-0,6408	-0,8773	-1,3238	-0,6192	-0,7245	-0,5629	-1,2843	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-0,9827	0,0451	-0,58586
25	-740 a -240	-0,9884	-0,7096	-0,2511	-0,7640	-1,0294	-1,1015	-0,1444	-0,3971	-0,5629	-1,1243	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-0,9827	0,0451	-0,63566

26	-715 a -215	-0,9884	-0,7096	-0,2511	-0,7640	-1,0294	-1,1015	-0,1444	-0,3971	-0,5629	-1,1243	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-0,9827	0,0451	-0,63566
27	-690 a -190	-0,9884	-0,7096	-0,2511	-0,7640	-1,0294	-1,1015	-0,1444	-0,3971	-0,5629	-1,1243	-0,6619	-0,5719	-0,9136	-0,9827	0,0451	-0,63566

4.4 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO *TNF* E O CARCINOMA VESICAL

4.4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

A Tabela 9 mostra as frequências alélicas para cada polimorfismo, entre pacientes portadores de tumor vesical e controles saudáveis, bem como os valores relativos ao teste exato de Fisher e OR. Nenhum dos polimorfismos analisados listados na Tabela 9 foi associado com susceptibilidade ou proteção ao tumor vesical

Os haplótipos previamente definidos no estudo anterior foram comparados entre pacientes e controles, objetivando-se buscar haplótipos relacionados com susceptibilidade ao tumor (Tabela 10).

Nenhum dos haplótipos encontrados no Brasil nas nossas análises mostrou-se associado com o desenvolvimento do tumor vesical.

Tabela 9. Frequência alélica relativa dos pontos de variação nos dois grupos (casos e controles), valor de p pelo teste exato de Fisher e cálculo da Odds Ratio (OR), com intervalo de confiança 95% (IC 95%). Admitiu-se erro alfa de 5%, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$.

Pontos de variação	Casos	Controles	Exato de Fisher	Odds Ratio	IC 95%
-1211 T/C	0,7800	0,7750	1,0000	1,0350	0,5717 a 1,8740
-1184 C/T	0,9940	0,9800	0,5604	3,260	0,2916 a 36,440
-1043 C/A	0,8480	0,8920	0,3589	0,6721	0,3153 a 1,4330
-1037 C/T	0,8840	0,8920	1,0000	0,9225	0,4196 a 2,0280
-986 C/T	0,9880	0,9900	1,0000	0,9020	0,07175 a 8,964
-826 G/A	0,9880	1,0000	0,5254	0,3171	0,01506 a 6,676
-752 A/C	0,9820	0,9900	1,0000	0,5314	0,05449 a 5,181
-556 G/A	0,9630	0,9510	0,7534	1,3570	0,4033 a 4,5690
-488 G/A	0,9120	0,9410	0,4822	0,6696	0,2487 a 1,8030
-424 G/A	0,9880	1,0000	0,5254	0,3170	0,01506 a 6,676
-418 G/A	0,9500	0,9020	0,1365	2,1200	0,8075 a 5,5630

Tabela 10. Frequência haplotípica relativa dos pontos de variação nos dois grupos (casos e controles), valor de p pelo teste exato de Fisher e cálculo da Odds Ratio (OR), com intervalo de confiança 95% (IC 95%). Admitiu-se erro alfa de 5%, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$.

Haplótipo	Casos	Controles	Exato de Fisher	Odds Ratio	IC95%
H01	0,5427	0,5882	0,5257	0,8307	0,5038
H02	0,0122	0,0098	1,0000	1,2470	0,1116
H03	0,0061	0	1,0000	1,8810	0,0758
H04	0,0061	0,0098	1,0000	0,6196	0,0383
H08	0,0366	0,0490	0,7534	0,7367	0,2189
H09	0,0122	0	0,5254	3,1540	0,1498
H10	0,0122	0	0,5254	3,1540	0,1498
H12	0,0183	0,0490	0,2666	0,3615	0,0844
H13	0,1159	0,1078	1,0000	1,0840	0,4931
H14	0,1220	0,0882	0,4263	1,4350	0,6264
H15	0,0854	0,0588	0,4822	1,4930	0,5547
H16	0,0122	0	0,5254	3,1540	0,1498
H17	0,0122	0,0196	0,6390	0,6173	0,0855
H18	0,0061	0,0196	0,5604	0,3067	0,0274

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a variabilidade e a estrutura da região promotora do gene *TNF* em uma amostra de 133 indivíduos da população brasileira da cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, comparando os resultados encontrados com dados disponibilizados pelo projeto *1000Genomes*. Esta abordagem permitiu uma avaliação global da variabilidade da região promotora do gene *TNF* no mundo, considerando 15 populações distintas. Foram encontrados 11 pontos de variação na população brasileira estudada e 15 pontos de variação considerando todas as populações analisadas (dados do projeto *1000Genomes* e amostras brasileiras). Considerando a frequência global de cada ponto de variação (Tabela 4), 9 polimorfismos apresentaram frequência superior a 1% para o alelo menos frequente e 5 polimorfismos tiveram frequência superior a 5% para o alelo menos frequente (posições -1211, -1043, -1037, -488 e -418). No geral, estes polimorfismos frequentes apresentaram LD entre si, evidenciado principalmente pelo baixo número de haplótipos frequentes. De fato, com base nesses polimorfismos, 20 haplótipos foram inferidos. Desses, apenas 4 haplótipos foram frequentes em todas as populações, aqui denominados H01, H08, H10 e H14, sugerindo que provavelmente eles são os mais antigos e originados antes da dispersão do homem à partir da África. Nota-se que três destes haplótipos, H01, H08 e H10 pertencem a uma mesma linhagem de haplótipos (marcados como azul na figura 4). Esta linhagem de haplótipos, todos carregando o alelo -1211T apresenta o haplótipo H01 como seu principal componente.

As duas linhagens definidas pelas relações haplotípicas, provavelmente, são muito antigas na história evolutiva humana, já que todas as populações avaliadas apresentaram haplótipos pertencentes a cada uma destas linhagens. A frequência do haplótipo H01 é a mais alta entre todas as populações avaliadas. No entanto, o haplótipo H12, embora com frequência reduzida quando comparado com o H01, provavelmente é o haplótipo mais antigo, em parte por ser semelhante ao encontrado em outros primatas. A linhagem derivada do haplótipo H01 é a mais frequente e parece ser a mais recente entre os haplótipos encontrados. Uma das hipóteses para esta discrepância (alta frequência de haplótipos mais recentes) parece caracterizar uma seleção positiva para os haplótipos que carregam -1211T (linhagem azul) antes mesmo da dispersão do homem à partir da África, visto que todos os haplótipos mais frequentes de ambas as linhagens estão presentes em todas as populações. O mecanismo subjacente à esta possível seleção positiva à favor do alelo -1211T não está claro, mas pode estar relacionado com expressão diferencial de *TNF* por conta de uma melhor ligação de fatores de transcrição na região do promotor e esta ligação poderia ser influenciada positivamente pela presença do

alelo -1211T. De fato, estudos já demonstraram que os polimorfismos -418, -488, -1037 e -1211 podem estar influenciando a expressão de *TNF* (Lindholm *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2005; Schaaf *et al.*, 2001; Huizinga *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1995). Embora o haplótipo H12 seja o precursor dos haplótipos da linhagem mais antiga (cor amarela), este haplótipo está presente apenas em populações africanas ou com forte componente africano, como o Brasil, que recebeu escravos vindos da África durante a época da colonização. Durante boa parte do século XIX, muitos escravos trabalharam nos cafezais das regiões paulistas. Este fenômeno poderia indicar que o haplótipo H12 provavelmente foi eliminado de outras populações, provavelmente por não ser adequado em ambientes com menor carga de patógenos. No entanto, é possível que as mutações que ocorreram no H12, em especial a mutação -1043 e -418, tenham de alguma forma tornado esses haplótipos mais adequados, explicando sua frequência relativamente elevada em todas as populações.

As análises de variabilidade genética devem levar em consideração forças que podem estar envolvidas nas alterações das frequências alélicas e haplotípicas, entre elas mutação, migração e seleção natural (Tajima, 1989). Notou-se que os valores de D de Tajima calculados foram em geral negativos para a maioria das janelas. Em algumas populações, todos os valores calculados foram negativos. Estes valores de D de Tajima podem indicar um excesso de alelos de baixa frequência, indicando expansão populacional ou seleção positiva. Embora efeitos demográficos possam estar relacionados com os valores obtidos, acreditamos que isto não tenha ocorrido no presente conjunto de dados, visto que todas as populações avaliadas apresentaram valores negativos de D de Tajima. Desta forma, este desvio da neutralidade detectado corrobora a teoria de uma seleção positiva à favor dos haplótipos portadores de -1211T.

Os haplótipos inferidos e relação entre eles foram avaliados na população global e demonstrou que a população brasileira possui o maior número de haplótipos sendo a que possui o maior grau de variabilidade dentre as populações estudadas. No Brasil as frequências dos haplótipos foram similares as frequências da população europeia TSI (residentes da Toscana na Itália) esta similaridade pode ser explicada pela história de formação da população brasileira do estado de São Paulo, que apresenta como principal componente de ancestralidade as populações de origem europeia (Ferreira *et al.*, 2006; Muniz *etal.*, 2008).

Dos 20 haplótipos a população brasileira estudada não possui os seguintes: H03 (YRI, LWK, ASW e MXL), H05 (TSI, CHB e CHS), H06 (CHS), H07 (CEU), H11 (CHB e CHS) e H19 (CHB e JPT) (Tabela 7), esses haplótipos estão presentes em baixa frequência nessas populações africanas, asiáticas, mexicanas e europeias.

Muitos estudos relataram a presença de alguns polimorfismos desse gene relacionando com o aumento ou a diminuição da produção da citocina TNF. Esta mudança na capacidade de produção do TNF estaria associado com doenças, como por exemplo a resposta a tratamento com drogas anti-retrovirais e susceptibilidade à infecções em indivíduos imuno-comprometidos (Deghaide *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010). O estudo da expressão desse gene é muito importante, pois este desempenha um papel fundamental na inflamação e afeta também a transformação de células, a proliferação e crescimento tumoral (Mantovani, 2005; Van heel, Udalova, Silva, *et al.*, 2002).

Os polimorfismos -418, -488, -1037, -1211 foram descritos em trabalhos anteriores influenciando a expressão de *TNF*, eles podem afetar a transcrição e expressão deste gene, e têm influência em doenças associadas com níveis elevados de TNF (Lindholm *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2005; Schaaf *et al.*, 2001; Huizinga *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1995). O polimorfismo com o alelo mutante -418A (Lin *et al.*, 2004; Appoloni *et al.*, 2004) é um potente ativador transcricional, sendo que o alelo -418A aumentou de seis a sete vezes o poder de transcrição de *TNF* (Wilson *et al.*, 1997). Embora polimorfismos do gene *TNF* tenham sido relatados influenciando a transcrição de *TNF* e a susceptibilidade à tumores, nossos resultados com base nos dados analisados indicam que os polimorfismos do *TNF*, seja na forma de alelos ou haplótipos, não estão relacionados com susceptibilidade ao carcinoma vesical nas amostras brasileiras. Esta falta de associação pode ser uma consequência do pequeno tamanho amostral de pacientes e controles.

Um estudo futuro deverá contar com um aumento do tamanho amostral da população brasileira, e comparar outros fatores como a resposta a tratamento através de imunoterapia. Esses polimorfismos podem influenciar mais a imunoterapia do que a susceptibilidade ao tumor, em resposta a estimulação micobacteriana pela BCG as células uroteliais secretam citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF (De Reijke *et al.*, 1993; Esuvaranathan *et al.*, 1995).

6 CONCLUSÃO

A avaliação da variabilidade da região promotora do gene que codifica o Fator de Necrose Tumoral (*TNF*) apresentou 11 pontos de variação na população brasileira deste estudo e as populações do *1000Genomes* apresentaram 15 pontos de variação. A relação entre os haplótipos da população brasileira e do *1000Genomes* demonstrou que no Brasil as frequências foram similares as frequências da população europeia.

A relação entre os 20 haplótipos demonstrou a presença de 2 linhagens que são antigas na história evolutiva humana. O desvio da neutralidade detectado corrobora a teoria de uma seleção positiva à favor dos haplótipos portadores de -1211T.

Considerando a análise dos dados das amostras brasileiras de casos e controles deste estudo, seja na forma de alelos ou haplótipos, não estão relacionados com susceptibilidade ao carcinoma vesical nas amostras brasileiras.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cytokines. In. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Saunders, 2003a. p.243-274.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Immunity to Tumors. In. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Saunders, 2003b. p.391-410.

ABBAS, A. K. *et al.* **Cellular and molecular immunology**. 6th. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010. viii, 566 p.

ABRAHAM, L. J.; KROEGER, K. M. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. **J Leu Biol**. 66:562-566; 1999.

AHIRWAR, K.; ANIL, M.; ANAND, D.; PRAVIN, K.; RAMA, D. Association of tumour necrosis factor alpha gene (T-1031C, C-863A, and C-857T) polymorphisms with bladder cancer susceptibility and outcome after bacille Calmette-Guérin immunotherapy. **BJU International**, p. 867-873, 2008.

APANIUS, V. *et al.* The nature of selection on the major histocompatibility complex. **Crit Rev Immunol**, v. 17, n. 2, p. 179-224, 1997.

APPOLONI, O.; DUPONT, E.; VANDERCRUYS, M.; ANDRIENS, M.; DUCHATEAU, J.; VINCENT, J. L. Association Between the TNF-2 Allele and a Better Survival in Cardiogenic Shock. **Chest**. 125;2232-2237; 2004.

APPOLONI, O.; DUPONT, E.; VANDERCRUYS, M.; ANDRIENS, M.; DUCHATEAU, J.; VINCENT, J. L. Association of Tumor Necrosis Factor-2 Allele with Plasma Tumor Necrosis Factoralpha Levels and Mortality from Septic Shock. **Am J Med** Apr 15;110(6):486-8. 2004.

BARRETT, J. C. *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-5, 2005.

BERGGREN, P.; STEINECK, G.; ADOLFSSON, J.; HANSSON, J.; JANSSON, O.; LARSSON, P.; SANDSTEDT, B.; WIJKSTROM, H.; HEMMINKI, K. p53 mutations in urinary bladder cancer. **Br J Cancer**, v.84, n.11, p.1505-11, Jun 1, 2001.

BETTENS, F.; PASSWEG, J.; GRATWOHL, A.; CHALANDON, Y.; HELG, C.; CHAPUIS, B.; SCHANZ, U.; LIBURA, J.; ROOSNEK, E.; TIERCY, J.M. Association of TNFd and IL-10 polymorphisms with mortality in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. **Transplantation**, v.81, p.1261-1267, 2006.

BLACK, R. A.; RAUCH, C. T.; KOZLOSKY, C. J.; PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; WOLFSON, M. F; *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumor necrosis factor- α from cells. **Nature**.385(20):729-733; 1997.

BOGUNIA-KUBIK, K.; POLAK, M.; LANGE, A. TNF polymorphisms are associated with toxic but not with GVHD complications in the recipients of allogeneic sibling haematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v.3, p.617-622, 2003.

- BORDEN, L. S. JR; CLARK, P. E.; HALL, M. C. **Bladder cancer**. *Curr Opin Oncol*; 17:275-80, 2005.
- BORGHANS, J.; BELTMAN, J.; BOER, R. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics*. 55:732-739. 2004.
- CASTELLI, E. C. Polimorfismos dos genes HLA-G e de citocinas em pacientes com histórico de carcinoma de células transicionais da bexiga urinária. Tese de doutorado. Ribeirão Preto, 2007.
- CASTELLI, E. C. *et al.* In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol*, v. 70, n. 12, p. 1020-5, 2009.
- CASTELLI, E. C. *et al.* The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun*, v. 11, n. 2, p. 134-41, 2010.
- CASTELLI, E. C. ; MENDES-JUNIOR, C. T. ; VEIGA-CASTELLI, L. C. ; ROGER, M. ; MOREAU, P. ; DONADI, E. A. . A Comprehensive Study of Polymorphic Sites Along the Hla-G Gene: Implication for Gene Regulation and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, p. on-line-on-line, 2011.
- CLARKE, B.; KIRBY, D. Maintenance of histocompatibility. *Nature*, 211:999-1000, 1966.
- COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 420:885-891, 2002.
- CORREA, P.; GOMEZ, L. M.; CADENA, J. and ANAYA, J. M. Autoimmunity and tuberculosis. **Opposite association with TNF polymorphism**. 2005.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. The lower urinary tract. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: WB Saunders, p.997-1010, 1999.
- DE REIJKE, T. M.; VOS, P. C. N.; BEVERS, R. F. M.; DE MUINCK KEIZER, W. H.; KURTH, R.; SCHAMHART, D. H. J. **Cytokine production by the human bladder carcinoma cell line T24 in the presence of Bacillus Calmette-Guerin**. *Urol Res*, 21:349-52, 1993.
- DEGHAIDE, N. H. S.; RODRIGUES, M. L. V.; CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; FIGUEIREDO, J. F. C.; DONADI, E. A. Tumor necrosis factor region polymorphisms are associated with AIDS and with cytomegalovirus retinitis. *AIDS* 23:1641-1647, 2009.
- DEININGER, P. L.; BATZER, M. A. Alu Repeats and Human Disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 67, 183–193, 1999.
- DEMETER, J.; PORZSOLT, F.; RAMISCH, S.; SCHMID, M. AND MESSER, G.: Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in hairy cell leukemia. *Br J Haematol*, 97: 132, 1997.
- DOHERTY, P. C.; ZINKERNAGEL, R. M. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 256:50–52, 1975.

EBLE, J. N.; SAUTER, G.; EPSTEIN, J. I.; SESTERHENN, I. A. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs. In: **World Health Organization Classification of Tumors**. Lyon: IARC, p.89-157, 2004.

EKBLOM, R.; SAETHER, S.A.; FISKE, P.; KALAS, J.A.; HÖGLUND, J. Balancing selection, sexual selection and geographic structure in MHC genes of Great Snipe. **Genetica**, 18, 453–461, 2010.

EPSTEIN, J. I. The lower urinary tract and male genital system. In: KUMAR, V., ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: Elsevier Saunders, p.1023-58, 2005.

ESUVARANATHAN, K.; ALEXANDROFF, A. B.; MCINTYRE, M.; JACKSON, A. M.; PRESCOTT, S.; CHISHOLM, G. D., et al. **Interleukin-6 production by bladder tumors is upregulated by BCG immunotherapy**. J Urol, 154:572-5, 1995.

EXCOFFIER, L. *et al.* Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. **Hum Genomics**, v. 1, n. 1, p. 7-19, 2003.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FELÍCIO, L. P.; PORTO, I. O. P.; MENDES-JUNIOR, C. T.; VEIGA-CASTELLI, L. C.; SANTOS, K. E.; VIANELLO-BRONDANI, R. P.; SABBAGH, A.; MOREAU, P.; DONADI, E. A.; CASTELLI, E. C. Worldwide HLA-E nucleotide and haplotype variability reveals a conserved gene for coding and 3 untranslated regions. **Tissue Antigens**, v. 8, p. 82-93, 2014.

FERREIRA, L. B.; MENDES-JUNIOR, C. T.; WIEZEL, C. E.; LUIZON, M. R.; SIMOES, A. L. Genomic ancestry of a sample population from the state of Sao Paulo, Brazil. **Am J Hum Biol**. 18: 702–5. 2006.

GALLAGHER, G.; ESKDALE, J.; OH, H. H.; RICHARD, S. D.; CAMPBELL, D. A. AND FIELD, M.: Polymorphisms in the TNF gene cluster and MHC serotypes in the West of Scotland. **Immunogenetics**, 45: 188, 1997.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 361-72, 1992.

HARROW, J. et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. **Genome Res**, v. 22, n. 9, p. 1760-74, 2012.

HEDRICK, P. W. Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. **Evolution** 56:1902-1908, 2002.

HONCHEL, R.; MCDONNELL, S.; SCHAID, D. J.; THIBODEAU, S. N. Tumor necrosis factor-alpha allelic frequency and chromosome 6 allelic imbalance in patients with colorectal cancer. **Cancer Res**, v.56, n.1, p.145-9, Jan 1, 1996.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R. C.; BRUFORD, E. A.; KHODIYAR, V. K.; LUSH, M. J.; POVEY, S.; TALBOT, C. C.; JR WRIGHT, M. W.; WAIN, H. M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. **Nat Rev Genet**, v.5, n.12, p.889-99, Dec, 2004.

HUGHES, A. L.; NEI, M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. **Nature** 335:167–170, 1988.

HUGHES, A. L.; NEI, M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. **Proc Natl Acad Sci USA** 86:958–962, 1989.

HUGHES, A. L.; NEI, M. Models of host-parasite interaction and MHC polymorphism. **Genetics** 132:863–864, 1992.

HUGHES, A. L.; YEAGER, M. Natural selection and the evolutionary history of major histocompatibility complex loci. **Front Biosci**, v. 3, p. d509-16, 1998.

HUIZINGA, T. W.; WESTENDORP, R. G.; BOLLEN, E. L.; KEIJERS, V.; BRINKMAN, B. M.; *et al.* TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. **J Neuroimmunol** 72: 149–153, 1997.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade de câncer no Brasil. Disponível em. 2008. Disponível em: < [http:// www.inca.gov.br/estimativas/2008](http://www.inca.gov.br/estimativas/2008)>.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931-45, 2004.

JONGENEEL, C. V.; BRIANT, L.; UDALOVA, I. A.; SEVIN, A.; NEDOSPASOV, S. A.; CAMBON-THOMSEN, A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. **PNAS** 88: 9717-9721, 1991.

KIMURA, M. The Neutral Theory of Molecular Evolution. **Cambridge University Press**, Cambridge, MA, 384 pp, 1983.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. **N Engl J Med**, v.343, n.10, p.702-9, Sep 7, 2000a.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. Second of two parts. **N Engl J Med**, v.343, n.11, p.782-6, Sep 14, 2000b.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **Mol Immunol**, v.34, n.5, p.391-9, Apr, 1997.

KULSKI, J. K.; DUNN, D. S. Polymorphic Alu insertions within the Major Histocompatibility Complex class I genomic region: a brief review. **Cytogenet Genome Res** 110:193–202, 2005.

LAMM, D. L.; **Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer.** *J Urol*,134:40-7, 1985.

LEWONTIN, R.; GINZBURG, L.; TULJAPURKAR, S. Heterosis as an explanation for large amounts of genic polymorphism. **Genetics** 88, 149-170. 1978.

LIN, M. T.; ALBERTSON, T. E. Genomic polymorphisms in sepsis. **Crit Care Med.** 32:569-79. 2004.

LIN, W. J.; YEH, W. C. Implication of toll-like receptor and tumor necrosis factor - α signaling in septic shock. **Shock.** 24(3):206-209. 2005.

LINDHOLM, E.; BAKHTADZE, E.; CILIO, C.; AGARDH, E.; GROOP, L.; *et al.* Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications. **PLoS One** 3: e2546, 2008.

LISCHER, H. E.; EXCOFFIER, L. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. **Bioinformatics**, v. 28, n. 2, p. 298-9, 2012.

LORENZO-ROMERO, J. G.; SALINAS-SANCHEZ, A. S.; GIMENEZ-BACHS, J. M.; SANCHEZ-SANCHEZ, F.; ESCRIBANO-MARTINEZ, J.; SEGURA-MARTIN, M.; HERNANDEZ-MILLAN, I. R.; VIRSEDA-RODRIGUEZ, J. A. Prognostic implications of p53 gene mutations in bladder tumors. **J Urol**, v.169, n.2, p.492-9, Feb, 2003.

MALIK, S. T.; GRIFFIN, D. B.; FIERS, W.; BALKWILL, F. R. Paradoxical effects of tumour necrosis factor in experimental ovarian cancer. **Int J Cancer**, v.44, n.5, p.918-25, Nov 15, 1989.

MALKKI, M.; SINGLE, R.; CARRINGTON, M.; THOMSON, G.; PETERSDORF, E. MHC microsatellite diversity and linkage disequilibrium among common HLA-A, HLA-B, DRB1 haplotypes: implications for unrelated donor hematopoietic transplantation and disease association studies. **Tissue Antigens** 66: 114–124, 2005.

MANTOVANI, A. Cancer: inflammation by remote control. **Nature**, 435: 752–3, 2005.

MARSH, H. P.; HALDAR, N. A.; BUNCE, M.; MARSHALL, S. E.; LE MONIER, K.; WINSEY, S. L.; CHRISTODOULOS, K.; CRANSTON, D.; WELSH, K. I.; HARRIS, A. L. Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation. **Br J Cancer**, v.89, n.6, p.1096-101, Sep 15, 2003.

MUNIZ, Y. C.; FERREIRA, L. B.; MENDES-JUNIOR, C. T.; WIEZEL, C. E.; SIMOES, A. L. Genomic ancestry in urban Afro-Brazilians. **Ann Hum Biol.** 35: 104–111. 2008.

O'SHEA, J. J.; MA, A.; LIPSKY, P. Cytokines and Autoimmunity. **Nat Rev Immunol.** 2:37-45, 2002.

PARK, K. S.; MOK, J. W.; RHO, S. A. AND KIM, J. C.: Analysis of TNFB and TNFA NcoI RFLP in colorectal cancer. **Mol Cells**, 8: 246, 1998.

PARKS, R. R.; YAN, S. D.; HUANG, C. C. Tumor necrosis factor-alpha production in human head and neck squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**, v.104, n.7, p.860-4, Jul, 1994.

PENN, D. J. *et al.* MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 17, p. 11260-4, 2002.

PRESCOTT, S.; JAMES, K.; HARGREAVE, T. B.; CHISHOLM, G. D.; SMYTH, J. F. **Intravesical Evans strain BCG therapy: quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall.** *J Urol*, 147:1636-42, 1992.

RAGHAVAN, D. Advanced bladder and urothelial cancers. **Eur J Cancer**, v.36 Suppl 2, p.1-6, Jul, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J Hered**, v.86, p.248-9, 1995.

REZNIKOFF, C. A.; SARKAR, S.; JULICHER, K. P.; BURGER, M. S.; PUTHENVEETIL, J. A.; JARRARD, D. F.; NEWTON, M. A. Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. **Urol Oncol**, v.5, n.5, p.191-203, Sep 1, 2000.

RUBIN, B.Y. *et al.*, Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. **J Exp Med**, v.164, n.4, Oct 1, p. 1350-5. 1986.

SANTOS, K. E. ; LIMA, T. H. A. ; FELICIO, L. P. ; MASSARO, J. D. ; PALOMINO, G. M. ; SILVA, A. C. A. ; OLIVEIRA, S. F. ; SABBAGH, A. ; GARCIA, A. ; MOREAU, P. ; DONADI, E. A. ; MENDES-JUNIOR, C. T. ; CASTELLI, E. C. . Insights on the HLA-G evolutionary history provided by a nearby Alu insertion.. **Molecular Biology and Evolution**, 2013.

SCHAAF, B. M.; SEITZER, U.; PRAVICA, V.; ARIES, S. P.; ZABEL, P. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter gene polymorphism and increased tumor necrosis factor serum bioactivity in farmer's lung patients. **Am J Respir Crit Care Med**, v.163, n.2, p.379-82, Feb, 2001.

SHALABY, M. R.; AGGARWAL, B. B.; SVEDERSKY, L. P.; FINKLE, B. S.; PALLADINO, M. A. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon- gama and tumor necrosis factors. **J Immunol**, 135: 2069-2075, 1986.

SHIINA, T. *et al.*, The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. **J Hum Genet**, v. 54, n. 1, p. 15-39, 2009.

SILVA, M. M.; SIMÕES, R. T.; CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DEGHAIDE, N. H.; TSUDA, L. C.; MACHADO, A. A.; DONADI, E. A.; FERNANDES, A. P. TNF microsatellite alleles may confer protection against the development of lipodystrophy syndrome in Brazilian HIV patients. **Int J Immunogenet**.37(5):379-85. Oct 2010.

SILVEIRA, R. C. *et al.*, Níveis de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa. **Jornal de Pediatria**. Vol. 79, Nº4, 2003.

SMITH, J. A., JR. Patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder and their smoking status. **Cancer**, v.86, n.11, p.2192-4, Dec 1, 1999.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am J Hum Genet**, v.68, n.4, p.978-89, Apr, 2001.

STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **Am J Hum Genet**, v. 73, n. 5, p. 1162-9, 2003.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123:585-595. 1989.

TAKAHATA, N.; NEI, M. Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. **Genetics** 124, 967-978. 1990.

THE 1000GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1061-73, 2010.

THE 1000GENOMES PROJECT CONSORTIUM. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 56-65, 2012.

TINAZZI, E.; FICARRA, V.; SIMEONI, S.; ARTIBANI, W.; LUNARDI, C. Reactive arthritis following BCG immunotherapy for urinary bladder carcinoma: a systematic review. **Rheumatol Int**, v.26, n.6, p.481-8, Apr, 2006.

TIRABOSCHI, R. B.; DIAS-NETO, J. A.; TUCCI, J. R. S. Fatores de risco em carcinomas de células transicionais da bexiga. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.3, p.20-23, 2002.

TONET, A. C.; NOBREGA, O. T. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, 2008. Disponível em http://revista.unati.uerj.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-98232008000200010&lng=pt&nrm=iso.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.853-9. 2002.

UNDLIEN, D. E. *et al.* HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? **Trends Genet**, v. 17, n. 2, p. 93-100, 2001.

VAN HEEL, D. A.; UDALOVA I. A.; SILVA, A. P. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. **Hum Mol Genet**, 11: 1281-9, 2002.

VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W.; BEYAERT, R.; FIERIS, W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. **Trends in Cell Biol.** 1995;5:392-399.

VEIGA-CASTELLI, L. C. *et al.* Non-classical HLA-E gene variability in Brazilians: a nearly invariable locus surrounded by the most variable genes in the human genome. **Tissue Antigens**, v. 79, n. 1, p. 15-24, 2012b.

VENTER, J. C. A part of the human genome sequence. **Science**, v. 299, n. 5610, p. 1183-4, 2003.

VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1304-51, 2001

VIRANI, S. et al. Cancer epigenetics: a brief review. **ILAR J**, v. 53, n. 3-4, p. 359-69, Dec 2012.

VITALE, R. F.; ANDRADE, F. R. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. V.73(1):123-7, 2007.

WALSH, E. C.; MATHER, K. A.; SCHAFFNER, S. F.; FARWELL, L.; DALY, M. J.; PATTERSON, N.; CULLEN, M.; CARRINGTON, M.; BUGAWAN, T. L.; ERLICH, H.; CAMPBELL J, BARRETT J, MILLER K, THOMSON G, LANDER ES, RIOUX JD. An Integrated Haplotype Map of the Human Major Histocompatibility Complex. **Am. J. Hum. Genet.** 73:580–590, 2003.

WANG, M. et al. A novel XPF -357A>C polymorphism predicts risk and recurrence of bladder cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 13, p. 1920-8, Apr 1 2010.

WARZOGHA, K.; RIBERO, P.; BIENVENU, J.; ROY, P.; CHARLOT, C.; RIGAL, D.; COIFFIER, B. AND SALLES, G.: Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. **Blood**, 91: 3574, 1998.

WILSON, A. G.; DI GIOVINE, F. S.; DUFF, G. W. Genetics of tumour necrosis factor-alpha in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. **J Inflamm**, v.45, n.1, p.1-12, 1995.

WILSON, A. G.; SYMONS, J. A.; MCDOWELL, T. L.; MCDEVITT, H. O.; DUFF, G. W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor-a promoter on transcriptional activation. **Immunol.** 94:3195–3199. 1997.

XU, Z.; DZIARSKI, R.; WANG, Q.; SWARTZ, K.; SAKAMOTO, K. M. Gupta D. Bacterial Peptidoglycan-Induced TNF-a Transcription Is Mediated Through the Transcription Factors Egr-1, Elk-1, and NF- B. **Am Assoc Immunol.** P. 6975-6982, 2001.

YAO, Y.; SHI, L.; SHI, L.; LIN, K.; YU, L.; SUN, H.; HUANG, X.; TAO, Y.; YI, W.; LIU, S.; CHU, J. The association between HLA-A, -B alleles and major histocompatibility complex class I polymorphic Alu insertions in four populations in China. **Tissue Antigens**. 73, 575 – 581, 2009.

