UNIVERSIDADE DE SÂO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA e OTORRINOLARINGOLOGIA.

POLIMORFISMOS DOS GENES DA REGIÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL EM PACIENTES COM AIDS APRESENTANDO OU NÃO RETINITE PELO CITOMEGALOVÍRUS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor.

Ribeirão Preto
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÂO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA e OTORRINOLARINGOLOGIA.

POLIMORFISMOS DOS GENES DA REGIÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL EM PACIENTES COM AIDS APRESENTANDO OU NÃO RETINITE PELO CITOMEGALOVÍRUS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor.

Aluno: NEIFI HASSAN SALOUM DEGHAIDE
ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO ANTONIO DONADI

Ribeirão Preto
2007

NEIFI HASSAN SALOUM DEGHAIDE

POLIMORFISMOS DOS GENES DA REGIÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL EM PACIENTES COM AIDS APRESENTANDO OU NÃO RETINITE PELO CITOMEGALOVÍRUS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.

Ribeirão Preto
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Neifi Hassan Saloum Deghaide

Polimorfismos dos genes da região do Fator de Necrose Tumoral em pacientes com AIDS apresentando ou não Retinite pelo Citomegalovírus.
Ribeirão Preto, 2007
134 p; 30 cm; ilustrações.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

1.Microssatélites. 2.TNF. 3.Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. 4. Retinite por Citomegalovírus.

Dedicatória

- A ***José Calil Deghaide***, meu querido esposo, pelo carinho, amizade e cumplicidade e as nossas queridas e preciosas bênçãos que adquirimos com nosso amor, ***Letícia Saloum Deghaide e Laís Saloum Deghaide.***

"O Senhor o guiará continuamente,
Satisfará os seus desejos
numa terra ressequida pelo sol
e fortalecerá os seus ossos.
Você será como um jardim bem regado
Como uma fonte cujas águas
Nunca faltam."
Isaías 58:11

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas oportunidades e bênçãos recebidas;

Aos meus pais, Hassan K.Saloum e Maria Lúcia C. Saloum, e as minhas irmãs, Nadia H. Saloum Cintra, Nabia H. Saloum Pereira, Nájela H. Saloum Andrade e ao meu irmão Hassan Saloum, por estarem sempre presentes ao meu lado;

Ao Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi, docente da Divisão de Imunologia do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, meu grande amigo, chefe, e orientador, pela confiança que deposita em mim a cada dia, pelas muitas oportunidades oferecidas, pela disponibilidade constante e por ter aberto novas perspectivas na minha vida profissional;

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues, docente do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), por seu total apoio e oportunidade oferecida para obtenção do meu título de doutor, pela sua amizade e ainda por ter disposto do seu precioso tempo para ajudar com a análise estatística da tese;

À Bióloga Cássia Maria Paula Donadi, cuja boa amizade me proporcionou crescimento profissional e oportunidades de conhecer e trabalhar com meu chefe prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi e com a profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues;

À Profa. Dra Ana Paula Morais Fernandes, docente da Escola de Enfermagem da FMRP-USP, por ceder os primers bem como parte dos materiais utilizadaos para a tipificação dos microssatélites do TNF;

Ao Prof. Dr. José Fernando de Castro Figueiredo, docente da Divisão de Moléstias Infecciosas e Tropicais do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), pelo seu apoio em disponibilizar a coleta dos pacientes com AIDS da UETDI;

À minha amiga, Julia Keiko Sakamoto Hota, do Laboratório de Nutrição do HCFMRP-USP, por seu total e desprendido apoio a minha vida, por compartilhar comigo momentos bons e me ajudar em minhas dificuldades e por ter cedido grande parte dos materiais de laboratório para o desenvolvimento do projeto;

Ao meu amigo de Laboratório, Rubens Donizeti da Silveira, pela sua amizade e colaboração no projeto;

À Renata Toscano Simões, pela sua paciência em ensinar a tipifiacação dos Microssatélites da Região do Fator de Necrose Tumoral;

Ao meu estagiário Marcos Paulo de Souza Muniz, pela sua descontração e motivação;

Ao meu estagiário Rafael Formenton Cita, pelo excelente apoio técnico, amizade e disponibilidade;

Aos amigos do Laboratório de HLA: Elviane Campi Ferreira da Silva, Thaise Voltarelli, Ana Paula Batista Correa Lucera, Lucimar Batista Correa Lucera e Gustavo Visconde Martins, pela paciência, colaboração e amizade;

As secretárias, Amélia Baruffi, Maria Cecília Onofre, Rita Amâncio Diegues, e secretário Rogério Aparecido Mazzucato Castania, do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, pela gentileza para o prosseguimento desta tese;

Aos meus amigos e amigas do programa de pós-graduação, pelos momentos de descontração durante as práticas de laboratório, deixando o dia mais produtivo: Diane M. Rassi, Gustavo Martelli Palomino, Isabela Wastowski, Janaina Crispim Freitas, João Alexandre Três Pancotto, Mariana Machado da Silva, Renata Nahas;

E de forma muito especial, aos pacientes que participaram desta investigação, tornando possível a realização deste estudo e um agradecimento especial àqueles que precocemente partiram.

RESUMO

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma potente citocina pró-inflamatória que modula as respostas imunes contra infecções virais, estando bastante envolvido na patogenia da aids. O gene que codifica o TNF está localizado na região altamente polimórfica do Complexo Principal de Histocompatibilidade, apresentando seis microssatélites polimórficos (TNFa-f). Como os sítios polimórficos têm sido associados com a magnitude da produção de citocinas, no presente estudo avaliamos a freqüência de alguns sítios polimórficos na região do gene que codifica o TNF em pacientes apresentando aids, estratificados de acordo com a presença ou não de retinite por citomegalovírus (R-CMV).

Objetivos: tipificar os microssatélites TNF (a, b, c, d e e) e duas variações nucleotídicas pontuais na região promotora do gene do TNF (-238G/A e -308G/A), possivelmente envolvidos na susceptibidade ou proteção a R-CMV.

Métodos: estudamos 52 pacientes com aids e R-CMV, 170 com aids sem R-CMV, e ainda, 202 indivíduos com sorologia negativa para o HIV-1. DNA do sangue periférico foi amplificado e hibridado com iniciadores específicos. A tipificação dos microssatélites do TNF foi realizada de acordo com a mobilidade do DNA amplificado em géis de poliacrilamida. A análise estatística foi realizada, utilizando o teste exato de Fisher bicaudal, considerando significantes valores de $p< 0,05$. Para estimar a força das associações foram também calculados *odds ratio* (OR) e fração etiológica (FE) quando $OR > 1,0$ e, fração preventiva (FP), quando $OR< 1,0$.

Resultados: Em comparação com os controles, os alelos TNFb4 ($p = 0,0400$; OR= 0,6020; 95% IC= 0,3751-0,9661, FP= 0,1556), TNFc1 ($p= 0,0144$; OR= 0,5739; 95% IC= 0,3688-0,8930; FP= 0,2964) e TNF-238G ($p= 0,0358$; OR= 0,5105; 95% IC= 0,2785-0,9358 e FP= 0,4422) apresentaram freqüências diminuídas nos pacientes com aids e R-CMV, conferindo proteção contra o desenvolvimento de R-CMV. Os alelos

TNFc2 (p= 0,0144; OR= 1,7425: 95% IC= 1,120-2,711; FE= 0,1844) e TNF-238A (p= 0,0358; OR= 1,9589; 95% IC= 1,069-3,591; FE= 0,0847) apresentaram freqüências aumentadas nos pacientes com aids e R-CMV, conferindo susceptibilidade a R-CMV. Em relação aos controles, os alelos TNFa5 (p= 0,0146; OR= 2,0638; 95% IC= 1,161-3,669; FE= 0,0500), TNFb7 (p= 0,0358; OR= 2,3320 95% IC= 1,069-5,087; FE= 0,0319) e o TNF-308A (p= 0,0063; OR= 1,9575; 95% IC= 1,222-3,136; FE= 0,0705) apresentaram freqüências alélicas aumentadas no grupo de pacientes com aids sem R-CMV, conferindo susceptibilidade para o desenvolvimento de aids, enquanto que os alelos TNFb4 (p= 0,0210; OR= 0,6957; 95% IC= 0,5129-0,9436; FP= 0,1190) e TNF-308G (p= 0,0063; OR= 0,5109; 95% IC= 0,3189-0,8184; FP= 0,4504) apresentaram freqüências diminuídas nos pacientes com aids sem R-CMV, sugerindo ser esses alelos fatores de proteção contra o desenvolvimento de aids.

Conclusões: este é o primeiro estudo avaliando os alelos dos microssatélites do TNF na aids, apontando diversas associações entre alelos da região do gene que codifica o TNF com aids, e também com R-CMV.

SUMMARY

Tumor Necrosis Factor (TNF) is a potent inflammatory cytokine that modulates immune responses against viral infections, actively participating in the pathogenesis of Aids. TNF gene is located within the highly polymorphic Major Histocompatibility Complex, exhibiting six microsatellites (TNFa-f) and several single nucleotide polymorphisms (SNP). Since polymorphic sites have been associated with the magnitude of TNF production, in the present study we evaluated the frequency of some polymorphic sites observed in TNF codifying region in patients presenting with Aids, stratified according to the presence or not of retinitis caused by cytomegalovirus (R-CMV).

Objectives: TNF (a, b, c, d and e) microsatellites and the TNF (-238A/G and -308G/A) SNPs were typed as possible contributors to susceptibility to or protection against R-CMV development.

Method: 52 patients with Aids and R-CMV, 170 with Aids without R-CMV, and 202 healthy individuals exhibiting negative serology for HIV-1 were studied. Peripheral blood DNA was amplified and hybridized with specific oligonucleotide primers. TNF microsatellite typing and SNP assessment are performed evaluating to amplified DNA mobility in polyacrilamide gels. Statistical analysis was performed using the two-tailed Fisher's exact test, considered to be significant at $p< 0.05$. The strength of the associations was performed estimating by the *odds ratio* (OR) and the etiologic fraction (EF) when OR > 1,0, and preventive fraction (PF) when OR< 1.0.

Results: Compared to controls, the TNFb4 (p = 0.0400; OR= 0.6020; 95% CI= 0.3751-0.9661, PF= 0.1556), TNFc1 (p= 0.0144; OR= 0.5739; 95% CI= 0.3688-0.8930; PF= 0.2964) and TNF-238G (p= 0.0358; OR= 0.5105; 95% CI= 0.2785-0.9358; PF= 0,4422) alleles were underrepresented in Aids patients with R-CMV, conferring protection against R-CMV development. The TNFc2 (p= 0.0144; OR= 1.7425: 95% CI= 1.120-

2.711; EF= 0.1844) and TNF-238A (p= 0.0358; OR= 1.9589; 95% CI= 1.069-3.591; EF= 0.0847) alleles were overrepresented in Aids patients with R-CMV, conferring susceptibility to R-CMV. Compared to controls, TNFa5 (p= 0.0146; OR= 2.0638; 95% CI= 1.161-3.669; EF= 0.0500), TNFb7 (p= 0.0358; OR= 2.3320 95% CI= 1.069-5.087; EF= 0.0319) and TNF-308A (p= 0.0063; OR= 1.9575; 95% CI= 1.222-3.136; EF= 0,0705) alleles were overerepresented in Aids patients without R-CMV, conferring susceptibility to Aids development, whereas the TNFb4 (p= 0.0210; OR= 0.6957; 95% CI= 0.5129-0.9436; PF= 0.1190) and TNF-308G (p= 0.0063; OR= 0.5109; 95% CI= 0.3189-0.8184; PF= 0.4504) were underrepresented in Aids patients without R-CMV, protecting against Aids development.

Conclusion: this is the first report on the association of Aids and TNF microsatellites, highlighting many associations between the alleles of the TNF region with Aids and also with R-CMV.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO.....**1**

O CITOMEGALOVÍRUS.....**2**

Características Gerais.....2

Epdemiologia do CMV.....3

Manifestações Clínicas.....5

Infecção Congênita.....5

Infecção Pós-Natal em Hospedeiros Normais.....6

Infecção em Imunossuprimidos.....7

Retinite por Citomegalovírus (R-CMV**)**.....8

Sinais e Sintomas.....12

O FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF).....15

MICROSSATÉLITES DA REGIÃO DO TNF.....**16**

Microssatélites da Região do TNF em Doenças.....18

Polimorfismos da Região Promotora do TNF (-238GA e – 308GA**)**.....19

Polimorfismos da Região do TNF na AIDS.....20

2. OBJETIVOS.....21

3. CASUÍSTICA E MÉTODO.....**23**

DELINEAMENTO DO ESTUDO.....**24**

ASPECTOS ÉTICOS.....**25**

CASUÍSTICA.....**25**

Grupo I. Pacientes com AIDS e R-CMV.....25

Grupo II. Pacientes com AIDS sem R-CMV.....26

Grupo III. Pacientes com AIDS, Independentemente da Presença ou não de R-CMV.....27

Grupo IV. Controle Populacional.....27

MÉTODOS.....**27**

Exame Oftalmológico.....27

Coleta de Sangue Periférico.....30
Obtenção de DNA.....30
Tipificação dos Microssatélites do TNF.....31
Amplificação do DNA.....31
Análise do Produto Amplificado em Gel Poliacrilamida.....34
Coloração com Nitrato de Prata.....36
Registro dos Resultados.....36
Tipificação da Região Promotora do TNF.....38
Análise do Produto Amplificado em Gel Poliacrilamida.....40
Coloração com Nitrato de Prata.....40
Registro dos Resultados.....41
Análise Estatística.....42
Cálculo dos Valores de Probabilidade (p).....42
Cálculo do *Odds Ratio* (OR).....43
Cálculo da Fração Etiológica (FE).....43
Cálculo da Fração Preventiva (FP).....43

4. RESULTADOS.....**44**

FREQÜÊNCIA DOS ALELOS DOS MICROSSATÉLITES DO TNF.....**45**
FREQÜÊNCIA DOS ALELOS DO TNF-238 E TNF-308.....**52**
TESTE EXATO DE FISHER.....**58**

5. DISCUSSÃO.....**61**

6. CONCLUSÕES.....**70**

7. REFERÊNCIAS BIBIGLIOGRÁFICAS.....**72**

8. ANEXOS.....**90**

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1. O CITOMEGALOVÍRUS

1.1.1. Características Gerais

A maioria das infecções humanas causadas pelo citomegalovírus (CMV) é assintomática e a grande parte dos adultos possui anticorpos séricos contra o vírus. No entanto, quando ocorre manifestação clínica da infecção, sua apresentação pode ser diversa, levando, por vezes, a um quadro grave, eventualmente fatal. O CMV é um DNA vírus que, ao lado dos vírus Epstein-Baar, Varicela-Zoster e Herpes Vírus Simples, pertence à família *Herpesviridae*. O vírus tem envelope, tegumento e capsídio protéico com simetria icosaédrica, constituído por 162 capsômeros; medem aproximadamente 200nm e seus genomas são constituídos por DNA (ácido desoxirribonucleico) linear de fita dupla, com aproximadamente 240kb (MOCARSKY JR., 1996). Tem como característica principal a capacidade de formação de corpúsculos de inclusão intranucleares e citoplasmáticos no seu processo de multiplicação. É um agente oportunista, pois pode permanecer durante longos períodos em estado latente no hospedeiro. Os CMVs infectam diferentes espécies de animais, incluindo o homem; no entanto, é altamente espécie-específico. Esses vírus produzem alterações morfológicas nas células infectadas, como aumento de tamanho e inclusões virais intranucleares, que conferem a elas um aspecto peculiar (“olho de coruja”). Por essa razão, foi denominada “doença de inclusão citomegálica”, mesmo antes de o agente etiológico ter sido identificado (FIGUEIREDO et al., 1998; MARTINS et al., 1999).

1.1.2. Epidemiologia do CMV

A infecção pelo CMV é universal. Sabe-se que 80 a 90% da população tiveram contato com o vírus na infância, sendo o índice de infecção adquirida menor nos países desenvolvidos (STERN & ELEK, 1965; CABAU, 1980).

Constituem grupos de risco os imunodeprimidos, as gestantes, os indivíduos submetidos a grande número de transfusões e prostitutas (ADLER SP, 1983; DOERR et al., 1985). Estudo realizado nos Estados Unidos, avaliando grupos de crianças cuidadas em creches comparadas com as cuidadas em casa, mostrou que a taxa de excreção de vírus, bem como a soro positividade para CMV foi bem mais alta nas crianças das creches, demonstrando que conglomerados humanos é fator importante para aquisição da infecção (HUTTO et al., 1985). Contrapondo-se a esse estudo, na França, observou-se que crianças criadas em casa são mais freqüentemente infectadas do que as criadas em creches, tendo a mãe papel quase exclusivo como fonte de contágio (CABAU, 1980).

O homem parece ser o único reservatório para o CMV humano, e a transmissão pode ocorrer pelo contato pessoa a pessoa, direto ou indireto. A infecção congênita pode ocorrer em qualquer época da gestação sendo que as adquiridas nos primeiros meses são potencialmente mais graves. A aquisição do vírus pelo feto, via transplacentária, pode ocorrer de duas formas: durante a viremia da infecção primária aguda e devido à reativação do vírus que se encontrava em estado latente no organismo materno, não obstante a presença de anticorpos específicos na circulação (STAGNO et al., 1982). A infecção perinatal está relacionada à exposição do recém-nascido à secreção cervical, contaminado durante sua passagem pelo canal de parto, bem como exposto à contaminação com leite materno contendo CMV (GOLDMAN et al., 1969; STAGNO et al., 1980). Na forma adquirida, o mecanismo de transmissão é horizontal, ocorrendo através de secreções oro-faringeanas, urina, excreções do trato genital feminino, fluido espermático, aleitamento e sangue ou seus derivados. Assim, a transmissão vertical também deve ser considerada, principalmente porque, na criança, a excreção viral pode persistir durante anos, em conseqüência da infecção intra-útero ou perinatal. Da mesma forma que com outros herpesvírus, a infecção primária pelo

CMV resulta em infecção persistente ou recorrente. Nesse caso, quase sempre é devida à reativação de vírus latentes (FIGUEIREDO et al., 1998). Alguns estudos demonstram uma maior incidência dessa forma de transmissão em populações de baixo nível sócio econômico submetidas a condições mais desfavoráveis de higiene, habitação e saúde (HO, 1978). As transfusões e transplantes de órgãos, cada vez mais freqüentes, constituem um meio de transmissão iatrogênico de importância crescente nos dias de hoje. A propriedade do vírus de permanecer latente no interior de leucócitos e de outras células, reativando-se posteriormente, favorece essa forma de transmissão natural da infecção por CMV (BENSON et al., 1979; HENLE et al., 1970**;** KRUGMAN & KATZ, 1981).

A recorrência da infecção pode ser evidenciada pela eliminação intermitente do vírus e pode se prolongar durante anos. Essa eliminação intermitente pode ser devida a flutuações na viremia; dessa forma, a excreção viral somente seria detectável em períodos de alta viremia (WELLER, 1971), em conseqüência de variações antigênicas do vírus ou de modificações nas condições da pessoa infectada, sendo mais susceptíveis os indivíduos imunodeficientes. Em transplantados renais, foram descritos níveis de recorrência variando de 46 a 100%. Taxas semelhantes ocorrem em receptores de transplante cardíaco e de medula óssea (HO, 1982). A associação entre infecção pelo CMV e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids) é conhecida desde os primeiros relatos dessa doença e sua freqüência era tão alta que o CMV chegou a ser, inicialmente, considerado como possível agente etiológico da aids (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1981).

As altas taxas de prevalência da infecção pelo CMV, em pacientes com aids são conseqüências da similaridade de algumas formas de transmissão do HIV e do CMV, notadamente de sua transmissão através de relações sexuais e pelo compartilhamento de agulhas e seringas em usuários de drogas injetáveis.

1.1.3. Manifestações Clínicas

A infecção por CMV pode ser clinicamente classificada em cinco formas diferentes:

a) assintomática, a mais comum,

b) congênita, a segunda forma mais freqüente,

c) em imunodeprimidos, especialmente em pacientes com aids e em transplantados,

d) pós-transfusionais,

e) em indivíduos normais na forma mononucleose símile, com ou sem envolvimento de múltiplos órgãos.

Em algumas ocasiões, a infecção por CMV esteve associada, sem relação causal definida, com outras doenças como: Síndrome de Guillain-Barré, meningite asséptica, colite ulcerativa, megacolo tóxico, hepatite granulomatosa, miocardite, doença hemolítica auto-imune, púrpura trombocitopênica, retinite e neoplasias (BETTS RF, 1980; FRIEDMAN HM, 1981; HO M., 1978; PANNUTI CS, 1984).

1.1.3.1. Infecção Congênita

Uma vez que a imaturidade do sistema imunológico é um dos fatores implicados na patogênese da infecção pelo CMV, a doença é mais freqüente e mais grave, quando ocorre infecção fetal ou em prematuros. No entanto, mesmo nessas circunstâncias, a infecção subclínica é mais comum (REYNOLDS et al., 1974; ESTAGNO et al., 1982). Uma vez infectada, a criança elimina o vírus pela urina durante cinco anos ou mais, sendo encontrado na nasofaringe após dois a quatro anos. A quantidade de vírus, nesses locais, é muito grande e se assemelha à verificada em pessoas seriamente imunocomprometidas.

Das crianças congenitamente infectadas, cerca de 5% têm a doença generalizada típica e 5%, uma forma atípica. Os restantes 90% são constituídos por crianças com formas subclínicas e crônicas da infecção. Embora possa haver envolvimento orgânico múltiplo, a doença caracteristicamente acomete o sistema

nervoso central e o sistema fagocitário mononuclear, com ou sem envolvimento ocular ou auditivo. No que diz respeito ao envolvimento ocular, tem sido descrita a presença de coriorretinite, atingindo cerca de 12% dos casos (PASS et al., 1980). Ocorrem, ainda, em um porcentual significativo das crianças infectadas, retardo do crescimento intra-uterino, prematuridade, hérnia inguinal e microcefalia. Alterações laboratoriais são encontradas em até 90% dos casos e incluem elevação de transaminases, trombocitopenia, hiperbilirrubinemia, linfocitose com atipia celular e elevação de IgM contra o CMV no sangue do cordão.

1.1.3.2. Infecção Pós-Natal em Hospedeiros Normais

Classicamente, a doença se caracteriza por mal-estar geral, mialgia e febre baixa. Esse quadro caracteriza uma síndrome semelhante à mononucleose infecciosa (*mononucleosis like*) e ocorre, principalmente, após a infecção primária pelo CMV, sendo raramente observado durante os episódios de recorrência. A linfoadenopatia é pouco importante e acomete, sobretudo, os gânglios cervicais e axilares e se acompanha de hepatoesplenomegalia. É freqüente a irritação na garganta, sem faringite exsudativa, cefaléia e o aparecimento de exantema cutâneo maculopapular (CARLSTROM et al., 1968). As complicações dessa forma clínicas são raras e incluem pneumonia, endocardite, púrpura trombocitopênica, anemia hemolítica e retinite. A ocorrência de alterações de função hepática é tão comum que a hepatite já foi considerada como parte do quadro clínico da doença (HORSWITZ et al., 1979). A viremia é transitória, durando poucas semanas. A eliminação viral por secreções orofaríngeas se prolonga durante meses, e a presença do vírus, na urina, pode ser evidenciada anos após o desaparecimento dos sintomas.

O método mais seguro para a confirmação do diagnóstico de infecção pelo CMV é o isolamento viral, que pode ser feito a partir de diferentes materiais biológicos, como a urina, as secreções de orofaringe, as excreções genitais e o sangue. Entretanto, apenas o isolamento viral não permite a distinção entre a infecção primária e as reativações ou reinfecções. Dessa forma, o diagnóstico da infecção primária deve ser complementado pela análise sorológica. O diagnóstico sorológico pode ser feito por

meio de diferentes métodos e, habitualmente, pode ser presumido pela detecção de anticorpos de classe IgM, evidenciados por testes de imunofluorescência, radioimunoensaio ou ELISA. Esses anticorpos são detectados precocemente e persistem por doze a dezesseis semanas após o início das manifestações clínicas. Existem evidências de que anticorpos de classe IgG persistem durante anos após a infecção inicial. Habitualmente, os anticorpos de classe IgM não são detectados durante os episódios de recorrência da infecção.

Dessa maneira, o diagnóstico da infecção primária pode ser feito pelo isolamento viral, associado à demonstração de soroconversão ou pela detecção de IgM anti-CMV (GRIFFITHS et al., 1987). Outros métodos de diagnóstico virológico são também disponíveis na atualidade, como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR). Publicações de protocolos de PCR para a pesquisa do CMV no líquido céfalo-raquidiano (LCR) têm revelado resultados confiáveis para o diagnóstico *in vivo* de lesões do Sistema Nervoso Central (SNC) relacionadas ao CMV, com uma sensibilidade e especificidade em torno de 80 e 100%, respectivamente. Nas complicações do SNC, a detecção do CMV já está sendo baseada na pesquisa do LCR por PCR qualitativa. A PCR quantitativa é utilizada para estabelecer a extensão das lesões do SNC e acompanhar a eficácia do tratamento antiviral (MIURA et al., 2006).

1.1.3.3. Infecção em Imunossuprimidos

A infecção pelo HIV-1, quando não tratada, é marcada pelo declínio progressivo das células que compõem o sistema imune, especialmente no número de linfóciros T CD4+ circulantes, o que em um período variável de anos leva à morte por falência imune e infecções oportunistas (HAYNES et al, 1996). O citomegalovírus nunca abandona o organismo da pessoa infectada, permanecendo em estado latente e, quando baixa a imunidade do hospedeiro, a infecção pode ser reativada. A infecção por CMV é uma das mais sérias complicações em pacientes infectados pelo HIV com valores de linfócitos T CD4+ inferiores a 50 células/mm^3, já que a reativação do quadro infeccioso está associada à deficiência do sistema imunológico. Nesses pacientes, lesões ulceradas e dolorosas podem afetar todo o aparelho digestivo, havendo

comprometimento dos intestinos e do fígado (FIGUEIREDO et al., 1998). A infecção do SNC pelo CMV pode causar encefalite, mielite, polirradiculite e neuropatias multifocais. O diagnóstico é dificultado pela pouca sensibilidade e demora da cultura viral e pelo comprometimento da produção de anticorpos pelo sistema imune do paciente. A apresentação clínica de muitas encefalopatias causadas pelo CMV, os achados radiográficos e os exames liquóricos de rotina podem ser inespecíficos, sendo que o diagnóstico definitivo exige a identificação do DNA do vírus no cérebro ou no LCR (MIURA et al., 2006).

A morbidade e a mortalidade da infecção pelo CMV aumentam em pacientes imunossuprimidos, tanto na infecção primária como nos episódios de recorrência. As pessoas sob maior risco são aquelas submetidas à transplante de órgãos (principalmente as que utilizam diversos tratamentos coadjuvantes, incluindo anticorpo monoclonal), as com neoplasias malignas, tratadas por quimioterapia, especialmente doenças malignas do sistema fagocitário mononuclear. A doença se manifesta mais freqüentemente por sinais e sintomas da síndrome *mononucleosis-like*, previamente descrita, usualmente após um a quatro meses depois do transplante. A manifestação mais comum é a febre prolongada, associada à hepatoesplenomegalia, mialgia ou dores articulares (RUBIN et al., 1977); a pneumonia é a complicação mais comum e grave (MEYERS et al., 1975). No entanto, a ocorrência de coriorretinite pelo CMV é relativamente rara nessas circunstâncias. Quando se apresenta, pode ser unilateral ou bilateral e, mais freqüentemente, é subclínica; quando sintomática, caracteriza-se por perda da acuidade visual, borramento da visão e escotomas. A evolução pode ser progressiva e irreversível (NG et al., 1988; THAY-KEARNY & JABS, 1996).

1.1.4. Retinite por Citomegalovírus (R-CMV)

As infecções a Citomegalovírus estão difundidas. Na Alemanha, a seroprevalência ronda os 50-70%, e acima dos 90% nos homens homossexuais. Em vários indivíduos imunodeprimidos, (contagem de CD4 inferior a 50 células/mm^3), a reactivação da infecção a CMV pode conduzir à retinite. No passado, a retinite a CMV era uma doença comum associada à aids, conduzindo à cegueira em 30% dos doentes.

Isso ocorre principalmente em doentes não tratados, que são frequentemente diagnosticados em primeira linha com HIV (JACOBSON et al, 2000). Uma retinite inflamatória a CMV, geralmente com vitreite grave, é também possível no decurso de uma síndrome imune. Se a R-CMV não for diagnosticada e tratada a tempo, a visão do doente está sempre em risco. A alteração da visão está quase sempre associada a lesões, que não são reversíveis mesmo com tratamento adequado. É por isto que a R-CMV permanece sendo uma doença perigosa mesmo na era da quimioterapia anti-retroviral altamente potente (*highly active antiretroviral therapy-HAART*) se bem que melhorou substancialmente com a HAART (GOLDBERG et al,2003, SALZBERGER et al, 2005).

Apesar de ser rara em outras formas de imunossupressão, a R-CMV é a complicação ocular mais freqüente na aids, produzindo deteriorização da retina com marcada diminuição da acuidade visual quando acomete a parte central da retina (CARRASCO-FONT et al., 1995; THAY-KEARNY & JABS, 1996; FIGUEIREDO et al., 1998; MUCCIOLI & BELFORT-JUNIOR, 1999, CURI et al, 1999, DUALIBY et al, 1999), pelo menos nos países do Hemisfério Norte e na América do Sul. Mas, no que diz respeito a problemas oftalmológicos que levam as perdas visuais, é o mais freqüente no país, como um todo, atingindo 25 a 50% dos pacientes, em diferentes populações (BELFORT-JUNIOR & MUCCIOLI, 1995; RODRIGUES et al., 1996; FIGUEIREDO et al., 1998; MUCCIOLI & BELFORT-JUNIOR, 1999).

Estudos realizados em necropsias de pacientes com aids demonstram que a R-CMV é responsável por, aproximadamente, 95% do comprometimento ocular dos olhos estudados (MARTINS et al., 1999). O desenvolvimento da R-CMV ocorre comumente nos estágios mais tardios da aids, quando pacientes apresentam imunossupressão mais acentuada (HOLLAND GN, 1992). Pacientes, portanto, com contagem baixa de T CD4+ (<50 células/mm^3) têm risco aumentado de desenvolvê-la em algum momento do curso da doença (SCHRIER et al, 1995 e JABS et al,2004).

O lugar que a R-CMV ocupa na classificação das causas de problemas oftalmológicos associados à aids está relacionado, também, com o nível de desenvolvimento da região em que o paciente vive. Nos locais em que diversas doenças infecto-contagiosas têm prevalência alta, a R-CMV também ocorre, mas é

superada por outras causas. Por exemplo, foi relatado que, na África, o *Herpes zoster* oftálmico já se constitui um problema importante em fases precoces da infecção pelo HIV (VAN DE PIERRE et al., 1988). Além disso, em regiões pouco desenvolvidas, o paciente tem chance menor de atingir estágios avançados de imunossupressão, pois, para isso, precisaria sobreviver às freqüentes infecções oportunistas (RODRIGUES et al., 1996 e HAYNES et al, 1996).

Algumas vezes, pacientes com R-CMV, mesmo que já tenham conhecimento de que apresentam sorologia positiva para o HIV-1, ou mesmo diagnóstico de aids, omitem essa informação, o que dificulta a tarefa do oftalmologista (RODRIGUES et al., 1996).

Existem casos em que a R-CMV é a primeira manifestação clínica de infecção oportunista (HENDERLY et al., 1987), cabendo ao oftalmologista suspeitar do diagnóstico de aids, fazer as orientações pertinentes, tais como solicitar exames confirmatórios, comunicar o resultado ao paciente e encaminhá-lo ao infectologista. O tratamento deve ser supervisionado por esses dois especialistas, preferencialmente em colaboração com equipe multidisciplinar (FIGUEIREDO et al., 1998).

Levando-se em conta que a R-CMV representa nos pacientes com aids, a reativação de infecção adquirida em etapa anterior à imunossupressão, e que os métodos de diagnóstico virológico não permitem a diferenciação entre a infecção crônica e a doença em atividade, o diagnóstico da R-CMV é predominantemente clínico, feito pela observação das lesões pela oftalmoscopia binocular indireta e da pesquisa de condições sistêmicas do paciente. Devido a essas constatações, o cuidadoso monitoramento de pacientes com aids se faz necessário, pois com o aumento da sobrevida desses pacientes (KANTOR et al., 2004), a manutenção de uma boa visão, mantendo a qualidade de vida, é uma prioridade. Também é importante conhecer dados sobre a epidemiologia do CMV na região em que o paciente vive (FIGUEIREDO et al., 1998; MUCCIOLI & BELFORT-JUNIOR, 1999). O exame oftalmológico completo e alguns exames complementares (incluindo os que possam elucidar a presença de outras manifestações do CMV) podem ser importantes para o seguimento do paciente e para estabelecer até que ponto a perda visual decorre somente da retinite. A retinografia é fundamental para o controle da evolução do quadro clínico. Levando-se em conta a gravidade da R-CMV, sua rápida evolução e a

conseqüente necessidade de instituição precoce do tratamento, é importante, também, realizar a busca ativa dos casos (FIGUEIREDO et al., 1998).

A R-CMV, mesmo quando diagnosticada precocemente, tem prognóstico grave. Por essa razão, nos últimos anos, tem sido preconizada a abordagem terapêutica para a profilaxia da R-CMV (SCHRIER et al., 1995; ORAL GANCICLOVIR EUROPEAN AND AUSTRALIAN COOPERATIVE STUDY GROUP, 1995; SPECTOR et al., 1996; JABS et al, 2004), baseada em alguns fatores preditivos para o desenvolvimento dessa doença. É sabido que a R-CMV aparece em estágio avançado da aids, caracterizado por grande comprometimento da imunidade celular. A maior parte dos casos de R-CMV ocorre quando a contagem de linfócitos $CD4^+$ $\leq$50 células/mm^3. Esse é o principal fator de risco para a patogenia, sendo que o risco desses pacientes é 32,2 vezes maior do que o dos que têm valores de linfócitos $CD4^+$ entre 51-100/mm^3 (SPAIDE et al., 1995).

A forma de infecção pelo HIV deve ser considerada; a contaminação através de intercurso sexual (que é, também, uma das vias de transmissão do CMV) é um dos fatores de risco para o aparecimento da R-CMV, sendo o risco quatro vezes maior do que na transmissão através do uso de drogas injetáveis (SPAIDE et al., 1995).

Nos últimos anos, tem sido descrito que os pacientes em estágio avançado da aids apresentam elevados níveis de partículas virais em circulação (carga viral). Dessa forma, pode-se prever que, também, essa viremia elevada pode estar relacionada com maior risco de desenvolvimento da R-CMV (FIGUEIREDO et al., 1998).

1.1.4.1. Sianis e Sintomas

A maioria dos pacientes com R-CMV queixa de diminuição da acuidade visual, escomotas e moscas volantes. No quadro clínico clássico de R-CMV encontram-se placas necróticas esbranquiçadas e áreas hemorrágicas (Figura 1), geralmente, próximas às arcadas vasculares ou à cabeça do nervo óptico. A cicatrização das lesões acontece depois de ocorrer necrose, havendo atrofia das áreas comprometidas.

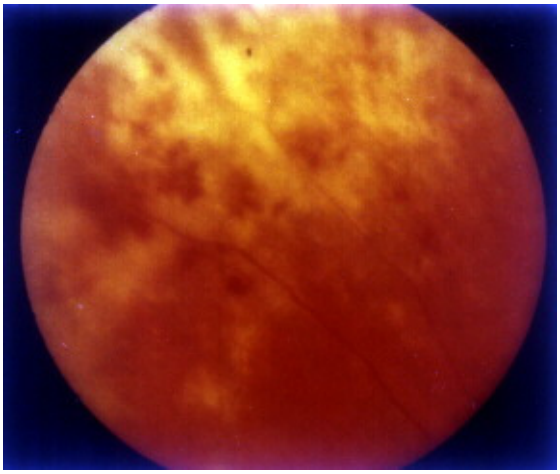


Figura 1 Forma "clássica" de R-CMV (*).

Aparecem, também, formas atípicas de R-CMV; em uma delas, a granular, infiltrados focais e granulares (Figura 2) levam à destruição da retina, com atrofia do epitélio pigmentar (podendo deixar partes da coróide visíveis à oftalmoscopia); e, em outra, a *frosted branch angiitis* (aspecto de "vasos congelados"), há embainhamento vascular (assinalado na Figura 3). Em alguns casos, a R-CMV pode se apresentar com duas, ou mesmo com três formas no mesmo olho. A mácula é atingida mais tardiamente e, se o tratamento for precoce pode ser poupada (MUCCIOLI & BELFORT-JUNIOR, 1999).

(*) - Retinografia de paciente não pertencente a este estudo, cedida pelo Prof. Dr. Nivaldo Vieira de Souza.

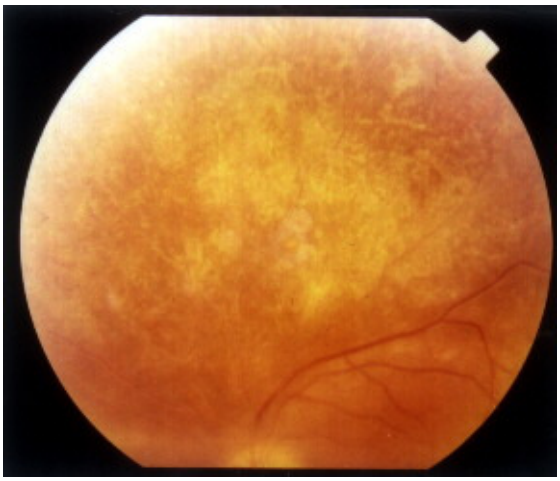


Figura 2 – Forma “granular” de R-CMV (infiltrados) (*).

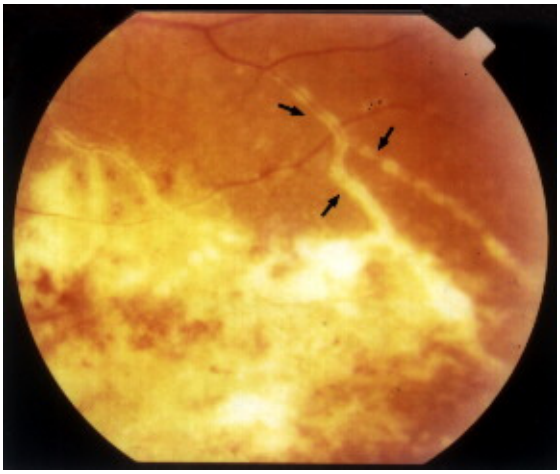


Figura 3 – Forma *“frosted branch angiitis”* de R-CMV (embainhamento vascular, assinalado) e forma clássica de R-CMV (*).

(*) - Retinografias de pacientes não pertencentes a este estudo, cedidas pelo Prof. Dr. Nivaldo Vieira de Souza.

Antes do advento da HAART, não se encontravam processos inflamatórios no vítreo de pacientes com R-CMV, uma vez que a presença desta retinite estava associada a uma imunodeficiência celular intensa. Depois da HAART, vitreítes não são raras e já foram relatados casos de edema macular cistóide e irite (CHENG et al., 1999; KARAVELLAS et al., 1999; CASSOU et al., 1999).

A partir de meados da década de 1990, foram introduzidos esquemas terapêuticos compostos por combinações de inibidores da transcriptase reversa, nucleosídeos e não nucleosídeos e/ou inibidores de protease, com o objetivo de controlar a replicação do HIV-1 e, por conseguinte, aumentar a contagem de linfócitos T CD4+, reconstituindo o sistema imunológico (HO, 1996). Esses esquemas resultaram em significativo aumento na sobrevida dos pacientes (PALELLA et al, 1998, RODRIGUES et al, 2007), mas infelizmente, complicações oculares relacionados à aids continuam a ocorrer, especialmente as infecções oportunistas, que muitas vezes deixam como seqüela a baixa visão ou a cegueira. Apesar dos esforços para conter-se a evolução fatal da aids, tem-se observado a ocorrência de resistência viral aos produtos disponíveis (KANTOR et al, 2004).

A HAART, disponível em vários países, inclusive no Brasil, mudou o perfil da aids e, conseqüentemente o da R-CMV, em pacientes com essa forma de imunossupressão, e sua abordagem terapêutica (JACOBSON et al., 1997; REED et al., 1997; DOAN et al., 1998; HERBORT & CHAVE, 1998; MITCHELL et al., 1999, JABS et al., 2004; RODRIGUES et al, 2007). Recomenda-se que se suspenda a medicação anti-CMV, que é feita predominantemente com Ganciclovir, Foscarnet ou Cidofovir (McDONALD, 1987; FIGUEIREDO et al., 1998; MUCCIOLI & BERLFORT-JUNIOR, 1999), em pacientes que voltem a ter níveis de linfócitos $CD4^+$ superiores a 200 células/mm^3, que tenham suas lesões cicatrizadas e nos qual a carga viral do HIV passe a níveis indetectáveis. O controle oftalmoscópico deve ser freqüente e, se houver reativação, o tratamento deve ser reinstituído, iniciando-se pela dose de ataque (POSTELMANS et al., 1997; REED et al., 1997; MITCHELL et al., 1999; WHITLEY & HOLLAND, 1999; JACOBSON et al., 2000; JABS et al., 2005).

Quando a terapêutica anti-CMV é interrompida, podem aparecer inflamações intraoculares, como vitreíte, papilite, edema de mácula e membranas epiretinianas (VAN DER HORST & WOHL, 1999).

Pode haver associação de R-CMV com outras manifestações oculares de infecções oportunistas, incluindo alterações de coróide e retina (FIGUEIREDO et al., 1998).

1.2. O FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)

O TNF é uma potente citocina pró-inflamatória codificada por gene localizado no braço curto do cromossomo 6 em humanos (região 6p 21.3), arranjado em seqüência com o gene da linfotoxina-α (LT) na chamada região de classe III do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex-MHC*), entre os genes que codificam as moléculas do MHC de classe II, DP, DQ e DR, e as moléculas de classe I, A, B e C (Figura 4) (revisto por HAJEER & HUTCHINSON, 2000).

O TNF foi originalmente caracterizado como citocina com atividade antitumoral, sendo considerado, atualmente, um dos principais mediadores inflamatórios. O TNF, dentre as suas diversas atividades biológicas, estimula a produção de colagenase e exerce potente efeito na síntese de vários componentes do tecido conectivo; atuando ainda sobre as metaloproteinases, a angiogênese e a proliferação de fibroblastos, tendo também, importante participação no remodelamento tecidual.

Os fagócitos mononucleares (monócitos/macrófagos) ativados são os principais produtores de TNF e os linfócitos, os principais produtores de lifotoxinas. Essas citocinas compartilham os mesmos receptores celulares e possuem as mesmas atividades biológicas, promovendo a quimiotaxia e ativação de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, permitindo a erradicação de microorganismos, e ainda, estão envolvidos nas reações inflamatórias locais. O TNF induz a síntese de outras citocinas inflamatórias como IL-1 e IL-8 e participa como importante regulador da resposta imune

inata, estando envolvido em processos patológicos como choque térmico, doenças auto-imunes, replicação viral e outros (AGGARWAL, SAMANTA & FELDMANN, 2000).

O TNF é considerado a principal citocina responsável pela doença do enxerto versus hopedeiro (GVHD-*Graft versus Host disease*), cujas manifestações clínicas se assemelham às da esclerose sistêmica (ARLETT, SMITH & JIMENEZ, 1999), podendo atuar no processo fibrótico pulmonar e sendo produzido basicamente por macrófagos (PANTELIDIS et al, 2001).

1.3. MICROSSATÉLITES DA REGIÃO DO TNF

A região do TNF tem cerca de 12 kb de comprimento e está localizada dentro do Complexo Principal de Histocompatibilidade. Essa região possue muitas regiões polimórficas, incluindo diversas repetições curtas de nucleotídeos *in tandem* (s*hort tandem repeats*-STRs), também denominadas de microssatélites, sendo relatados como TNFa, TNFb, TNFc, TNFd, TNFe e TNFf (UDALOVA et al., 1993; TSUKAMOTO et al., 1998; HAJEER & HUTCHINSON, 2001).

Os microssatélites TNFa e TNFb são repetições (GT)n e (GA)n, respectivamente, localizadas, aproximadamente, 3.5 kb teloméricas ao gene da LT-α. O TNFc é uma repetição (GA)n, localizada dentro do primeiro intron do gene LT-α. Os outros dois microssatélites TNFd e TNFe são repetições (GA)n situadas entre 8 e 10 kb centroméricas ao gene TNF e abaixo do gene LT-α (JONGENEEL et al.,1991; NEDOSPASOV et al*.,* 1991) e o TNFf é uma repetição (CA)n localizada acima do gene da LT-β. Cada microssatélite possui um número mínimo de alelos (UDALOVA et al*.,* 1993). A figura 4 ilustra a localização dos microssatélites da região do TNF e a Tabela 1 mostra a seqüência de nucleotídeos repetida, o número de alelos e seu tamanho.

Localização dos microssatélites do TNF no cromossomo 6p21

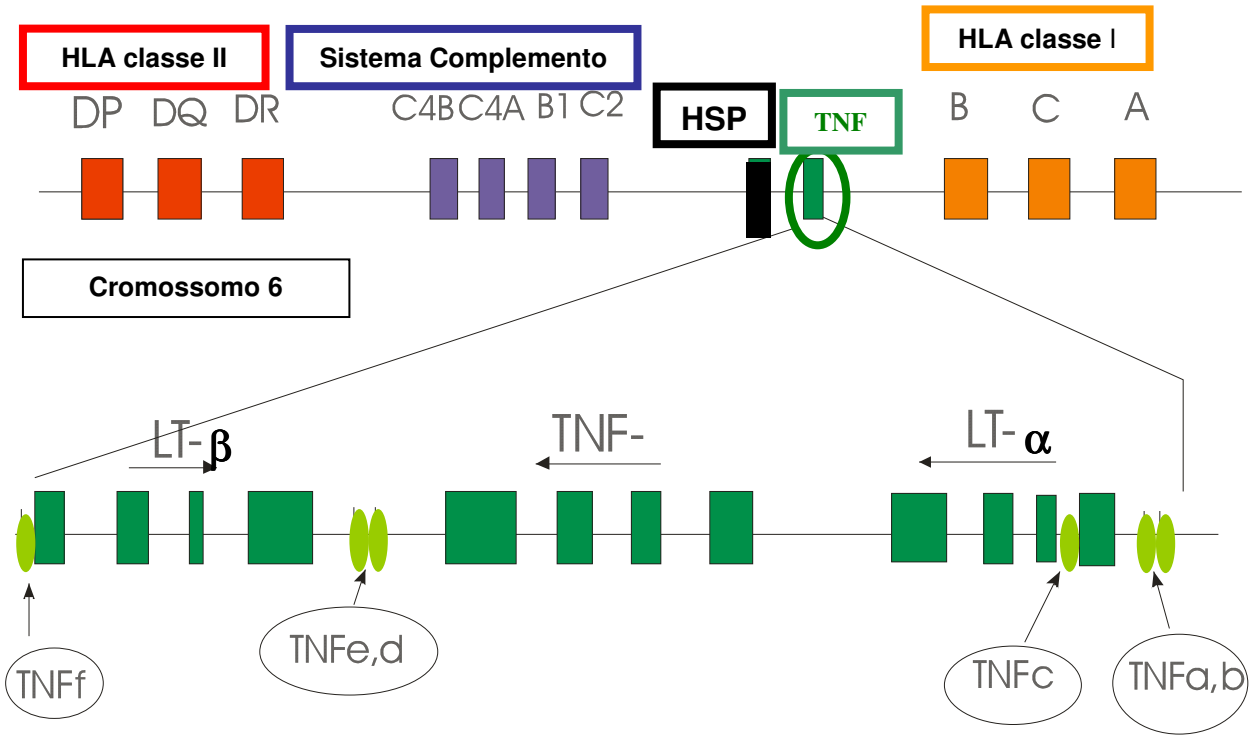


Figura 4 - Localização dos microssatélites da região do TNF (HAJEER, HUTCHINSON, 2000; TSUKAMOTO et al., 1998). TNF: Fator de Necrose Tumoral; LT: Linfotoxina; HSP: Proteína de Choque Térmico; HLA: Antígeno Leucocitário Humano.

Tabela 1 - Características dos microssatélites do gene TNF

Microssatélite	TNFa	TNFb*	TNFc	TNFd	TNFe	TNFf
Seqüência repetida	(GT)*n*	(GA)*n*	(GA)*n*	(GA)*n*	(GA)*n*-tipo	(CA)*n*
Número de alelos	14	7	2	7	3	10
Tamanho (pb)	99-125	125-131	159-161	124-136	98-102	

*TNFb consiste de repetições seguidas de mononucleotídeos. Embora seja dito que possui 7 alelos, os alelos 2 e 6 normalmente não estão presentes em populações européias (Hajeer & Hutchinson, 2001; Tsukamoto et al (1998)).

1.3.1. Microssatélites da Região do TNF em Doenças

Os microssatélites do TNF têm sido associados a várias doenças auto-imunes. Em indivíduos caucasianos ingleses com lúpus eritematoso sistêmico (LES), por exemplo, a freqüência do haplótipo TNFa2-TNFb1-TNFd3 mostrou-se aumentada, além de se encontrar em forte desequilíbrio de ligação com o haplótipo HLA-A1-B8-DR3 (HAJEER et al., 1997). Em pacientes gregos com LES houve aumento na freqüência do alelo TNFa11, em desequilíbrio de ligação com o HLA-DRB1*15 (TARASSI et al. 1998). Já em pacientes com artrite reumatóide (AR), o haplótipo TNFa6-TNFb5-TNFc1-TNFd4 foi associado ao haplótipo HLA-DRB1*0401-HLA-B44 (HAJEER et al., 1996). O alelo TNFa2 já foi relacionado à forma erosiva da doença, pois estudos in *vitro* demonstraram o aumento da produção de TNF em indivíduos com AR, apresentando esse alelo (MARTINEZ et al., 2000). Na esclerose múltipla (EM), a distribuição dos alelos TNFa11 e TNFb4 foi mais freqüente nos pacientes do que no grupo controle (KIRK et al., 1997). Em pacientes japoneses com esclerose sistêmica que apresentavam anticorpo anti-Scl-70, a freqüência do alelo TNFa13 estava aumentada (TACKEUCHIE et al., 2000).

Os microssatélites também têm sido estudados em certos tipos de tumores. No adenocarcinoma gástrico proximal e no câncer coloretal (GALLAGHER et al., 1997), tipos de câncer no qual a inflamação crônica é um fator predisponente, o alelo TNFa2 também foi encontrado em maior freqüência (KASEM et al., 1998). Assim, a alta produção de TNF pode promover a principal condição para o desenvolvimento do tumor, um fator indireto à suscetibilidade para essas doenças (HAJEER; HUTCHINSON, 2000). A homozigoze parece também ser um fator importante, pois em pacientes jovens com Carcinoma de Células Escamosas (SCC) de cabeça e pescoço, a freqüência do alelo TNF b3 é significantemente diferente em pacientes e controles, sendo a homozigose b3/b3 mais freqüente em pacientes com carcinoma de laringe do que nos controles, enfatizando a associação da homozigose desses alelos na suscetibilidade a esses cânceres (MATTHIAS et al., 1998).

1.3.2. Polimorfismos da Região Promotora do TNF (-238GA e -308GA)

Além dos microssatélites do TNF, diversas variações nucleotídicas pontuais, nos quais ocorre substituições de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms-SNP*) têm sido identificadas na região do TNF, tendo importância as SNPs localizadas na região promotora do gene, nas posições -238 e -308, sendo relacionadas à susceptibilidade a diversas doenças. Nessas posições é comum a presença de uma guanina (G). Em alguns alelos essas posições são substituídas pela adenina (A). A presença de uma adenina na posição -308 tem sido associada com aumento de transcrição do TNF quando comparado com o alelo G (KROEGER et al., 1997). Em estudos em pacientes com linfoma de Hodgkin, os níveis TNF foram maiores em pacientes com o genótipo -308GA (JUSZCZNSKI et al., 2002). Em indivíduos caucasóides com LES, o alelo TNF-308A conferiu susceptibilidade à doença, independentemente da presença do alelo HLA-DR3 (ROOD et al., 2000). Em indivíduos europeus, a freqüência do genótipo -308GA estava aumentada, conferindo assim, susceptibilidade ao LES (LEE, HARLEY and SWAPAN, 2006).

Estudos também têm sido realizados com o intuito de verificar associações das posições -238 e -308 da região promotora do TNF no desenvolvimento de câncer gástrico. Jang et al., 2001 observaram que a freqüência do alelo TNF-238A era muito baixa no grupo com câncer gástrico.

1.3.3. Polimorfismos da Região do TNF na AIDS

O genótipo TNF pode influenciar ainda na resposta inicial às infecções virais, tal como na neutralização do vírus e na sua eliminação (HOHLER et al., 1998; HAJEER, HUTCHINSON, 2000). Em pacientes portadores do HIV, a taxa de deterioração imunológica e a progressão para aids diferem entre os indivíduos infectados. Essa progressão pode ser influenciada pelo fenótipo do vírus, pela resposta imune do hospedeiro e por fatores genéticos. Uma associação entre os microssatélites do gene TNF e a taxa de progressão para aids mostrou que o alelo TNFc2 conferia certa proteção aos pacientes, estando relacionado ao desenvolvimento mais lento da doença. Esse alelo foi mais comum em pacientes com progressão lenta para aids (60%) em relação aos que *desenvolveram* a doença mais rapidamente (15%) (KHOO et al., 1997).

Assim, devido à importância que o TNF desempenha nas respostas imunes, inflamatórias, infecciosas, no câncer e nas doenças auto-imunes, e ainda, ao papel que as regiões gênicas ao redor do gene do TNF têm na produção dessa citocina, os estudos dos polimorfismos dessa região revestem-se de interesse em doenças. Então, neste estudo, avaliamos os microssatélites TNFa, TNFb, TNFc, TNFd e TNFe e os SNPs da região promotora em pacientes com aids, apresentando ou não R-CMV.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

2.1 determinar as freqüências dos microssatélites da região do TNF (TNFa, b, c, d, e e) em pacientes com aids e retintite por citomegalovírus (R-CMV);

2.2 determinar as freqüências dos microssatélites da região do TNF em pacientes com aids, sem R-CMV;

2.3. determinar as freqüências dos microssatélites da região do TNF, que pela força de associação, possam ser considerados marcadores imunogenéticos para a R-CMV ou para a aids;

2.4. determinar o polimorfismo da região promotora do TNF (SNPs -238 e -308) em pacientes apresentando ou não R-CMV;

Para tal, as seguintes comparações de freqüências foram efetuadas:

- Pacientes com aids e R-CMV, independentemente da etnia, com, pacientes com aids, sem R-CMV, e com indivíduos-controle, com sorologia negativa para o HIV;

- Todos os pacientes com aids, independentemente da etnia e da presença de R-CMV, com indivíduos-controle com sorologia negativa para o HIV-1;

.

CASUÍSTICA E MÉTODO

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo observacional, tipo caso-controle, no qual, independentemente do grupo a que pertencia, cada paciente com aids, diagnosticado segundo critérios vigentes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1993), foi submetido a um exame oftalmológico (com ênfase na oftalmoscopia binocular indireta) e a uma coleta de sangue periférico, para tipificação dos SNPs da região promotora e de microssatélites do TNF.

O diagnóstico de infecção pelo HIV-1 foi feito pela detecção de anticorpos no soro, por método imunoenzimático (Abbott® Recombinant HIV-1/HIV-2 – IEA, Chicago, USA). Os resultados positivos por esse método foram confirmados pelo teste de aglutinação de partículas de gelatina (Serodia®, Fujirebio Inc., Tokyo, Japan).

Os demais dados foram obtidos pela análise dos prontuários médicos dos pacientes, registrados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), incluindo a contagem de células $CD4^+$ e a quantificação da carga viral do HIV-1 ou viremia. As coletas da amostras de sangue para a realização desses exames foram feitas quando era necessária uma avaliação das condições sistêmicas do paciente, tendo sido utilizados, neste estudo, os resultados obtidos na data mais próxima ao exame oftalmológico.

A quantificação de células $CD4^+$ foi realizada, na rotina do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), pelo TriTEST®, com a utilização de TRUCOUNT *absolute count tubes*® (Becton-Dickinson, San Jose, California, USA) e citômetro de fluxo FACScan® da mesma procedência.

A quantificação da carga viral (HIV-1) foi feita na rotina do Laboratório de Sorologia do HCFMRP-USP, utilizado o Kit da Bayer Health Care LLC (Subsidiary of Bayer Cotporation Tarrytown, NY 10591-5097 USA).

3.2. ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP (Processo: n°4018/2007, Anexo 1). Os participantes, quando possível, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo2).

.

3.3. CASUÍSTICA

3.3.1. Grupo I – Pacientes com Aids e Retinite por Citomegalovirus (R-CMV)

Fizeram parte deste grupo, pacientes com aids e R-CMV, sendo a retinite diagnosticada por critérios clínicos, independente da fase da doença e de terem iniciado, ou não, tratamento com drogas virustáticas e que, espontaneamente ou por encaminhamento, procuraram atendimento oftalmológico no HCRP.

Foi critério de exclusão, a presença de doenças imunológicas associadas.

O Grupo I foi composto por 52 pacientes, sendo 39 do sexo masculino e 13 do sexo feminino, com idades variando de 21 a 77 anos (mediana = 35 anos); sendo 38 caucasóides, 1 oriental, 2 negros e 11 mulatos. Desses 52 pacientes, 43 faziam parte do Banco de Amostras do Núcleo em Pesquisas Imunogenéticas (BANPI), os quais participaram do projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa n°1525/1998 (RODRIGUES MLV, 2000).

Na data do exame oftalmológico, foi verificado o tempo de diagnóstico de aids que, nesse grupo, variou de um a 105 meses (mediana = 22 meses) e o número de infecções oportunistas sistêmicas anteriores a R-CMV, que variou de zero a seis (mediana = 3).

A contagem de células $CD4^+$ variou de 1 a 368 células/mm^3 (mediana = 31). A quantificação de carga viral variou de 400 a 8.500.000 cópias/mL (mediana = 85.000) e, consequentemente, seus logaritmos decimais variaram de 2,60 a 6,92 (mediana = 4,92). Apenas 19 (43,18%) desses pacientes estavam em uso de HAART. Entre os anti-retrovirais utilizados por ocasião da inclusão do paciente no estudo, foram identificados:

drogas anti-retrovirais pertencendo à classe de inibidores da trascripitase reversa análogo de nucleosídeos (ITRN), inibidores da trascripitase reverso não análogo de nucleosídeos (ITRNN), inibidores da protease (IP) e inibidores da fusão (IF).

Estes pacientes apresentavam infecções oportunistas sistêmicas, sendo que as mais freqüentes foram: candidíase, neurotoxoplasmose, pneumocistose e neurocriptococose.

3.3.2. Grupo II - Pacientes com aids sem R-CMV.

Fizeram parte deste grupo pacientes com aids, recrutados entre os que tinham retorno ao ambulatório da Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI) do HCFMRP-USP e que, depois de informados dos objetivos da pesquisa e dos exames a que seriam submetidos, concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento pós-informação, ou autorizaram seus acompanhantes a assiná-lo.

Os critérios de exclusão foram detecção de R-CMV ou alterações da coróide e retina com diagnóstico etiológico duvidoso.

Constituíram tal grupo 170 pacientes, sendo 107 do sexo masculino e 63 do sexo feminino, com idades variando de 21 a 62 anos (mediana = 37anos), sendo 144 caucasóides, 15 negros e 11 mulatos. Destes 170 pacientes, 114 pacientes faziam parte do BANPI, os quais participaram dos projetos submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa n°1525/1998 e n°8992/2001 (RODRIGUES MLV, 2000 e 2004).

Na data do exame oftalmológico, os pacientes do Grupo II tinham tempos de diagnóstico de aids que variaram de um a 108 meses (mediana = 20 meses) e tinham tido de zero a oito infecções sistêmicas oportunistas (mediana = 2). Desses pacientes, 160 (94%) estavam em uso de HAART. Entre os anti-retrovirais utilizados por ocasião da inclusão do paciente no estudo, foram: ITRN, ITRNN e IP.

A contagem de linfócitos $CD4^+$ variou de 4 a 1164 células/mm^3 (mediana = 588,34). A quantificação de carga viral variou de 80 a 2.000.000 cópias/mL (mediana = 85.000), e consequentemente, seus logaritmos variaram de 1,90 a 6,30 (mediana=4,51).

Estes pacientes apresentavam infecções oportunistas sistêmicas, sendo que as mais freqüentes foram: candidíase, neurotoxoplasmose, tuberculose e neurocriptococose.

3.3.3. Grupo III - Pacientes com Aids, independentemente da Presença ou não de R-CMV.

Esse grupo foi constituído pela soma dos pacientes dos Grupos I e II sendo, portanto, composto por 222 pacientes com aids apresentando características clínicas e laboratoriais já descritas.

3.3.4. Grupo IV - Controle Populacional

Participaram do Grupo IV, 202 indivíduos normais, com sorologia negativa para o HIV-1; sendo 146 do sexo masculino e 56 do sexo feminino com idades variando de 18 e 59 anos (mediana = 33 anos); sendo 162 caucasóides, 1 oriental, 16 negros e 23 mulatos. Esses indivíduos saudáveis faziam parte do BANPI, aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do HCFMRP-USP (nº7581/2007, anexo 3).

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Exame Oftalmológico

O exame oftalmológico inicial dos pacientes do Grupo I foi realizado por um de quatro observadores experientes e constou, predominantemente, de oftalmoscopia binocular indireta (realizada com oftalmoscópio Heine – Omega 100® (Herrschng, Germany) e lente Nikon® de 20 dioptrias), sob midríase medicamentosa, obtida com Tropicamida 1% (Mydriacyl®, Alcon, São Paulo, Brasil).

Sempre que os pacientes tiveram condições de informar, foi realizada a medida da acuidade visual central, com tabelas de “Snellen”. Quando se julgou pertinente, foram realizados, também, outros exames oftalmológicos.

Quando as condições sistêmicas dos pacientes e a infra-estrutura disponível permitiram, os participantes do Grupo I tiveram os achados da oftalmoscopia binocular indireta registrados em retinografias (algumas das quais apresentadas nas Figuras 5 a 10), realizadas em retinógrafo
Topcon® TRC-50X (Tokyo, Japan).

Figura 5 – Diversas formas de R-CMV (paciente do sexo masculino, 24 anos , branco).

Figura 6 – Exsudatos e infiltrados (paciente do sexo masculino, 35 anos, mulato).

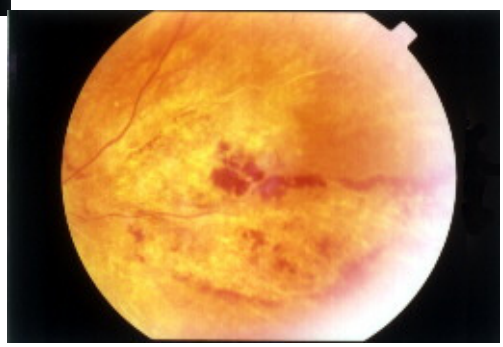
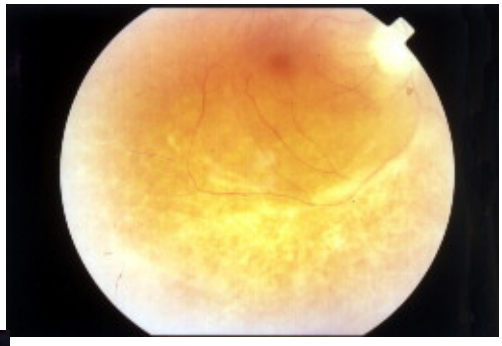


Figura 7 – Forma “clássica” e infiltrados (paciente do sexo masculino, 32 anos, branco).

Figura 8 – Infiltrados e vasculite (paciente do sexo masculino, 35 anos, branco).



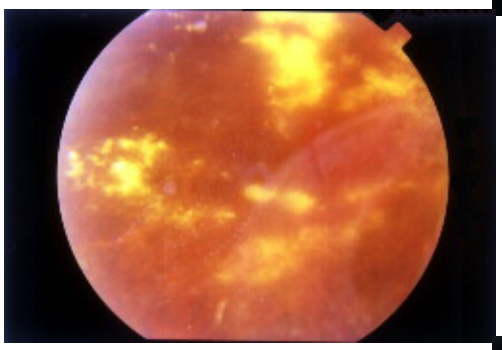


Figura 9 – Predomínio de forma “granular” (paciente do sexo masculino, 24 anos, branco).

Figura 10 – Forma “clássica” e infiltrados (paciente do sexo masculino, 40 anos, branco).

3.4.2. Coleta de Sangue Periférico

Foram colhidos 10mL de sangue periférico de cada indivíduo, utilizando-se tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA) contendo EDTA k3 (0,054mL/tubo).

3.4.3. Obtenção de DNA

Para a obtenção de DNA, utilizou-se o procedimento descrito por MILLER et al (1988), com pequenas alterações. O sangue periférico, contido em tubos com EDTA a 15%, foi transferido para tubo de 50 mL e recebeu adição de quatro volumes de tampão de lise de hemácias (sacarose 0,3M, Tris-HCl 10mM-pH 7,5, $MgCl_2$ 5mM e Triton X-100 1%), sendo a preparação homogeneizada e centrifugada a 4^oC (2400 x g, por 5 minutos).

Depois, retirou-se, cuidadosamente, o sobrenadante e o precipitado foi novamente suspenso em 4,5 mL de tampão de lise de leucócitos (NaCl 0,075M e Na_2EDTA 0,024M), 125 μL de SDS a 10% e 1,1 mL de perclorato de sódio a 5M. A seguir, agitou-se a mistura por 10 segundos, adicionou-se 2ml de NaCl saturado, agitou-se novamente (15 segundos) e centrifugou-se a temperatura ambiente (1500 x g, por 5 minutos), para extração de proteínas. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 50 mL, sendo então adicionados 7 mL de isopropanol absoluto.

A precipitação do DNA ocorreu por inversão manual, lenta, do tubo. O DNA foi retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e colocado em tubo tipo Eppendorf, estéril, com 1,7 mL de capacidade. Lavou-se, então, o DNA, duas vezes, com 3 mL de etanol 70%, sendo então dissolvido em 100-300 μL de tampão TE® (Tris-HCl 1M e EDTA 0,5M). Depois disso, o DNA foi homogeneizado e sua concentração, determinada por espectrofotometria, estipulando-se as absorbâncias em 260 e 280nm.

3.4.4. Tipificação dos Microssatélites do TNF

3.4.4.1. Amplificação do DNA

As reações de amplificação para os microssatélites foram realizadas utilizando-se 100ng de DNA de cada amostra. Duas reações de PCR foram utilizadas para obter os microssatelites do TNFa/b e TNFd/e e uma reação de amplificação para obter os microssatélites do TNFc. Para preparar a mistura da reação de amplificação, foram utilizados tubos de 0,2 mL, nos quais foram colocadas as seguintes concentrações de reagentes para cada grupo de microssatélites:

Tabela 2 – Reagentes utilizados para a primeira amplificação dos microssatélites do TNFa/b e TNFd/e

Reagente	Concentração	Quantidade(uL)
Água		19,15
Tampão	10 X	2,5
$MgCl_2$	50 mM	0,5
Iniciador 1	10 mM	0,75
Iniciador 2	10 mM	0,75
DNTP	20 mM	0,25
Taq Polimerase	5 U/ul	0,1
DNA	100 ng	1,0
Volume final		25,0

$MgCl_2$; cloreto de magnésio, dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

As seqüências dos iniciadores utilizados neste estudo estão listadas na Tabela 5, sendo designados IR-1 até IR-10. Para tipificação dos microssatélites TNFa/b, foi utilizado como primeiro iniciador o IR-1 e, o segundo IR3. Para os microssatélites TNFd/e, foi utilizado como primeiro iniciador o IR7 e, o segundo IR-10.

Tabela 3 – Reagentes utilizados para a segunda amplificação dos microssatélites do TNFa, TNFb, TNFd e TNFe

Reagente	Concentração	Quantidade(uL)
Água		19,9
Tampão	10 X	2,5
$MgCl_2$	50 mM	0,5
Iniciador 1	10 mM	0,75
DNTP	20 mM	0,25
Taq Polimerase	5 U/ul	0,1
DNA	100 ng	1,0
Volume final		25,0

$MgCl_2$; cloreto de magnésio, dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' tr,0ifosfato

Para a segunda amplificação foram utilizados os seguintes iniciadores: TNFa (IR2), TNFb (IR4), TNFd (IR8) e TNFe (IR9).

Tabela 4: Reagentes utilizados para amplificação do microssatélite do TNFc

Reagente	Concentração	Quantidade(uL)
Água		18,65
Tampão	10 X	2,5
$MgCl_2$	50 mM	0,5
Iniciador 1	10 mM	0,75
Iniciador 2	10 mM	0,75
DNTP	20 mM	0,25
Taq Polimerase	5 U/ul	0,1
DNA	100 ng	1,0
Volume final		25,0

$MgCl_2$; cloreto de magnésio, dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

Para amplificação do TNFc foram utilizados como iniciador 1 o IR5 e como iniciador 2 o IR6. Após as reações de amplificações do TNFc, os produtos de amplificação foram submetido ao aquecimento, ou seja, misturavam-se os produtos da PCR com o corante a 94°C por 10 minutos para a desnaturação da dupla fita de DNA e, imediamente após, eram aplicadas no gel de poliacrilamida.

Tabela 5 - Relação dos iniciadores seqüência - específicos utilizados:

Locus	Localização cromossômica	Seqüências iniciadoras
TNFa	6p21.3	**IR1** - 5'-GCC TCT AGA TTT CAT CCA GCC ACA –3'
		IR2 - 5'-CCT CTC TCC CCT GCA ACA CAC A -3'
TNFb	6p21.3	**IR3** - 5'- GCA CTC CAG CCT AGG CCA CAG A -3'
		IR4 - 5'-GTG TGT GTT GCA GGG GAG AGA G -3'
TNFc	6p21.3	**IR5** - 5'-GGT TTC TCT GAC TGC ATC TTG TCC -3'
		IR6 - 5'-TCA TGG GGA GAA CCT GCA GAG AA -3'
TNFd	6p21.3	**IR7** - 5'- AGA TCC TTC CCT GTG AGT TCT GCT –3'
		IR8 - 5'- CAT AGT GGG ACT CTG TCT CCA AAG –3'
TNFe	6p21.3	**IR9** - 5'-GTG CCT GGT TCT GGA GCC TCT C –3'
		IR10 - 5'- TGA GAC AGA GGA TAG GAG AGA CAG –3'

(UDALOVA et al., 1993)

Após a preparação da mistura da reação de amplificação, foram obedecidos os seguintes ciclos no termociclador (Applied Biosystems 9700), como mostrado nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Condições de amplificação do locus do TNFc e primeira amplificação dos loci dos TNFa/b TNFd/e

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	**94℃**	**5'**	**1X**
1. Desnaturação	**94℃**	**1'**	**28X**
2. Pareamento	**61℃**	**1'**	
3. Extensão	**72℃**	**1'**	
	72℃	**10'**	**1X**
	4℃	**∞**	

Tabela 7 - Condições de amplificação da segunda amplificação dos loci do TNFa,TNFb, TNFd e TNFe.

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	**94°C**	**5'**	**1X**
1. Desnaturação	**94°C**	**1'**	**32X**
2. Pareamento	**60°C**	**1'**	
3. Extensão	**72°C**	**1'**	
	72°C	**10'**	**1X**
	4°C	**∞**	

3.4.4.2. Análise do Produto Amplificado em Gel de Poliacrilamida

Os produtos de amplificação foram submetidos à separação por eletroforese em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poliacrilamida acrescidos de uréia (anexo 7).

Uma vez preparado, o gel era imediatamente aplicado a um cassete previamente montado. Esse cassete era composto por duas placas de vidro colocadas sobre um suporte, separadas por espaçadores de teflon e presas com grampos de aço. Logo após a aplicação do gel entre as placas, colocou-se um pente de teflon na borda superior, formando sulcos onde, posteriormente, eram aplicadas as amostras. O tempo de polimerização foi de aproximadamente 20 minutos.

Com o gel polimerizado, o pente era retirado e a placa contendo o gel foi montada em uma cuba de eletroforese vertical, contendo tampão TBE (o mesmo utilizado na preparação do gel, diluído 10 vezes) em ambos os pólos.

Para a realização da eletroforese, foram aplicados no gel 7 μL do produto amplificado, acrescidos de 5 μL de corante (azul de bromofenol, xilenocianol, ficoll, sacarose, EDTA e TBE, contendo formamida a 75 %).

Juntamente com as amostras, foram aplicados padrões de leitura (1 padrão para cada 4 amostras) previamente identificados em outras análises de microssatélites do TNF. Esses padrões de leitura foram obtidos por meio de uma escada alélica realizada com centenas de amostras randomizadas, tipificadas previamente e comparadas entre

si, objetivando-se a determinação dos alelos apresentando maiores ou menores números de repetições. A leitura prévia foi confirmada em novos géis, nos quais as amostras, que em princípio pareciam conter o mesmo alelo, foram aplicadas lado a lado, para que então uma amostra de cada alelo fosse escolhida para definir a Escada Alélica de cada sistema. Esta escada alélica vem sendo utilizada por nosso grupo como padrão para os microssatélites TNF em vários estudos prévios (SIMÕES RT et al 2003; SIMÕES RT et al, 2005; WASTOWSKI IJ et al, 2006). Em todas as análises de microssatélites realizadas pelo nosso grupo, as freqüências alélicas obtidas, coincidem com as freqüências alélicas descritas mundialmente em outras populações (REYNARD et al., 2000). Além disso, alguns dos padrões TNFd foram confirmados por seqüenciamento (WASTOWSKI, I.J. et al, 2006).

Adicionalmente, a escada alélica torna-se bastante útil em razão da dificuldade em se utilizar marcadores de peso molecular em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (separação eletroforética dos microssatélites do TNF), como utilizado neste estudo. Em contrapartida, o gel não desnaturante 10%, onde é possível a visualização de marcadores de peso molecular, não possui especificidade suficiente que assegure a adequada separação dos alelos, dificultando uma análise fidedigna dos resultados.

Cada gel foi submetido a uma corrente de 20mĄ, pelo tempo determinado para cada padrão. O tempo de eletroforese para cada padrão é mostrado na Tabela 8.

.

Tabela 8 - Tempo para eletroforese de cada locus estudado

Locus	**Tempo de eletroforese(hora)**
TNFa	2:10
TNFb	5:15
TNFc	3:00
TNFd	2:30
TNFe	2:15

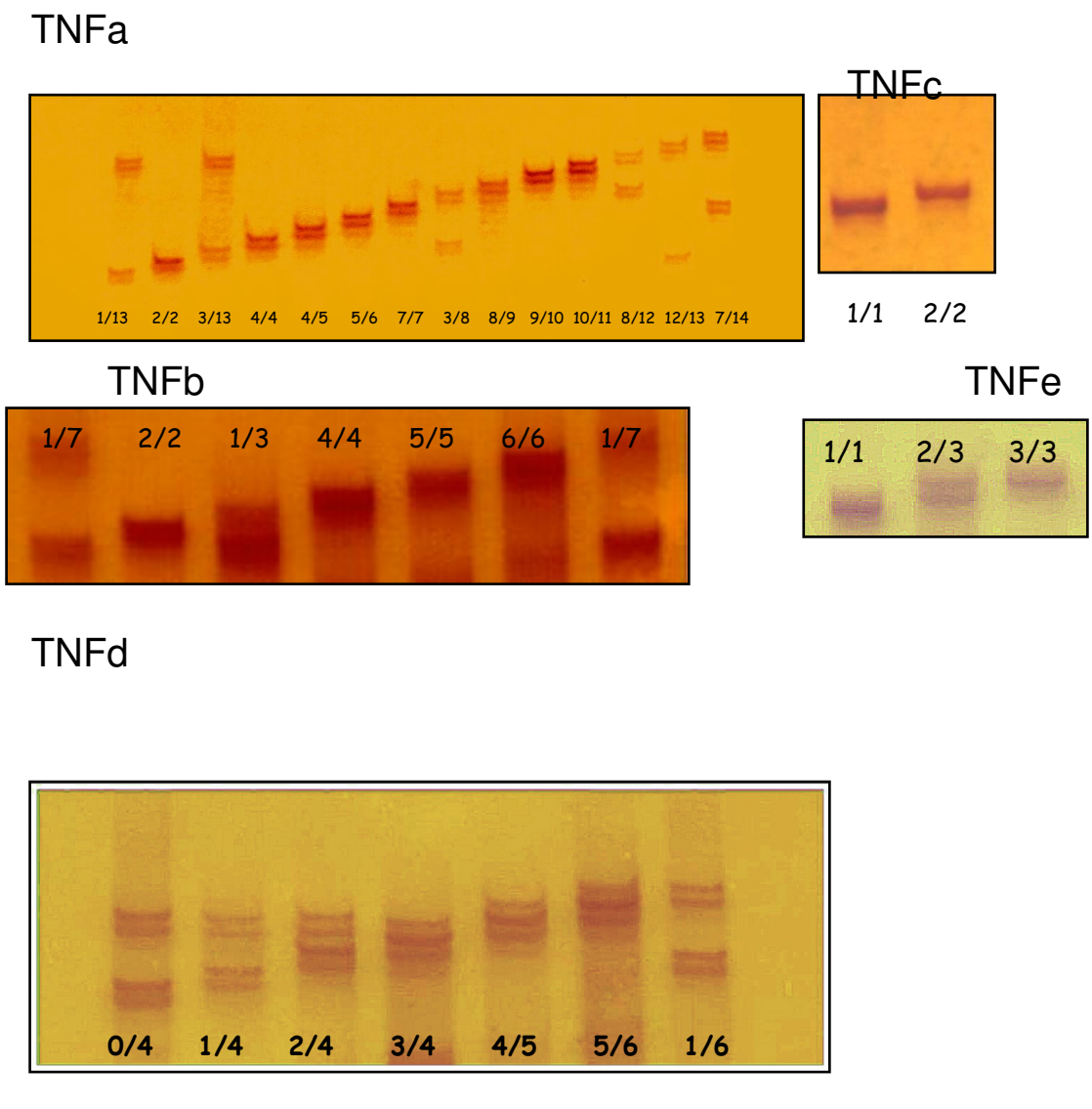
3.4.4.3. Coloração com Nitrato de Prata

Após ser retirado da placa, o gel foi colocado em 100 mL de solução fixadora acrescida de 1 mL de nitrato de prata (20 %), e mantida sob agitação à temperatura ambiente por cinco minutos. Depois desse tempo, a solução fixadora com prata foi descartada e o gel lavado com água. A água foi descartada e adicionou-se 100 mL de solução reveladora acrescida de 1 mL de formaldeído. O gel foi colocado sob agitação durante cinco minutos (os componentes das soluções fixadora e reveladora encontram-se no anexo 7)**,** e então a solução fixadora acrescida de formaldeído foi descartada.

3.4.4.4. Registros dos Resultados

Após a análise dos géis, estes foram secos e arquivados. A secagem foi feita colocando-se o gel entre duas folhas de papel celofone embebidas em água, sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente por um dia, conforme mostrado na Figura 11.

Figura 11 – Géis de poliacrilamida 12% mostrando a mobilidade eletroforética dos locos TNFa, TNFb, TNFc, TNFd e TNFe.



3.4.5. Tipificação da Região Promotora do TNF

O polimorfismo da região promotora do TNF foi avaliado quanto à presença dos SNPs -308GA e -238GA relacionados com atividade transcricional alterada.

Para a detecção desses polimorfismos, utilizamos sondas de oligonucleotídeos seqüência específicas, hibridados com DNA amplificado pela reação de polimeração em cadeia. Os iniciadores específicos para cada variante estão descritos nas Tabelas 9 e 10. Os reagentes estão mostrados nas Tabelas 11 e 12. Adicionalmente, os iniciadores HGBA. A e HGBA. S foram utilizados como controle interno de cada reação.

Tabela 9 - Iniciadores para detecção dos polimorfismos dos SNPs -308 do gene TNF.

INICIADOR	SEQÜÊNCIA (5'- 3')	AMPLICON	ALVO	REFERÊNCIA
TNFAA308.2 TNF Genérico	CAGCGGAAAACTTCCTTGGT	259 bp	TNF - 308 GA	TUGLULAR et al., 2003
TNFAS308G TNF Específico	ATAGGTTTTGAGGGGCATGG			MARSH et al., 2003
TNFAS308A TNF Específico	ATAGGTTTTGAGGGGCATGA			MARSH et al., 2003
HGBA.S	CGGTATTTGGAGGTCAGCAC	456 / 436 bp	Controle	Nosso Laboratório
HGBA.A	CCCACCACCAAGACCTACTT		Controle	Nosso Laboratório

Tabela 10 - Iniciadores para detecção dos polimorfismos dos SNPs -238 do gene TNF.

INICIADOR	SEQÜÊNCIA (5'- 3')	AMPLICON	ALVO	REFERÊNCIA
TNF 238 UP TNF Genérico	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	175 bp	TNF - 238 GA	TUGLULAR et al., 2003
TNFAS238G TNF Específico	CCCCATCCTCCCTGCTCC			MARSH et al., 2003
TNFAS238A TNF Específico	TCCCCATCCTCCCTGCTCT			MARSH et al., 2003
HGBA.S	CGGTATTTGGAGGTCAGCAC	456 / 436 bp	Controle	Nosso Laboratório
HGBA .A	CCCACCACCAAGACCTACTT		Controle	Nosso Laboratório

Tabela 11 - Concentrações de reagentes utilizados para a amplificação dos SNPs -308 do TNF.

Reagente	Concentração	Quantidade(uL)
Água		6,41
Tampão	10 X	1,0
$MgCl_2$	50 mM	0,3
DNTP	20 mM	0,14
HGBA S	10 uM	0,20
HGBA A	10 uM	0,20
308AA ou 308G	10 uM	0,30
TNF 308.2	10 uM	0,30
Taq Polimerase	5 U/ul	0,15
DNA	100 ng	1,0
Volume final		9,0

$MgCl_2$; cloreto de magnésio, dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

Tabela 12 - Concentrações de reagentes utilizados para a amplificação dos SNPs -238 do TNF.

Reagente	Concentração	Quantidade(uL)
Água		6,41
Tampão	10 X	1,0
$MgCl_2$	50 mM	0,3
DNTP	20 mM	0,14
HGBA S	10 uM	0,20
HGBA A	10 uM	0,20
238ª ou 238G	10 uM	0,30
TNF 238 UP	10 uM	0,30
Taq Polimerase	5 U/ul	0,15
DNA	100 ng	1,0
Volume final		9,0

$MgCl_2$; cloreto de magnésio, dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

Após a preparação da mistura da reação de amplificação, essas foram submetidas à amplificações nos seguintes ciclos no termociclador (Applied Biosystems 9700), conforme mostrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Perfil de ciclagem do SNP -308 e -238 do TNF**.**

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	**94℃**	**5'**	**1X**
1. Desnaturação	**94℃**	**45"**	**32X**
2. Pareamento	**64℃**	**45"**	
3. Extensão	**72℃**	**1'**	
	72℃	**5'**	**1X**
	4℃	**∞**	

3.4.5.1. Análise do Produto Amplificado em Gel Poliacrilamida

Os produtos de amplificação foram submetidos à separação por eletroforese em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poliacrilamida acrescidos de glicerol (Tabela 14).

Tabela 14 - Condições específicas para eletroforese de cada loco polimórfico estudado.

Loco	Gel	Voltagem	Tempo
TNF-308	10% não desnaturante	230V	1:30h
TNF-238	10% não desnaturante	230V	1:15h

3.4.5.2. Coloração com Nitrato de Prata

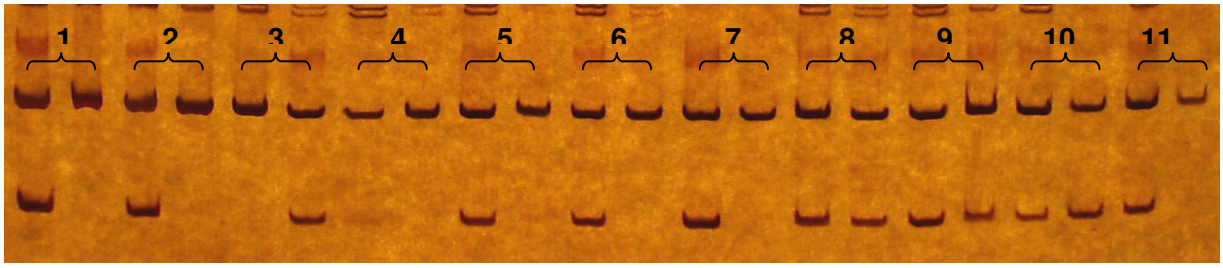
Após ser retirado da placa, o gel foi colocado em 100 mL de solução fixadora acrescida de 1 mL de nitrato de prata (20 %), e mantida sob agitação à temperatura ambiente por cinco minutos. Depois desse tempo, a solução fixadora com prata foi descartada e o gel foi lavado com água. A água foi descartada e adicionou-se 100 mL de solução reveladora acrescida de 1 mL de formaldeído. O gel foi colocado sob

agitação durante cinco minutos (os componentes das soluções fixadora e reveladora encontram-se no anexo 7)**,** e então a solução fixadora acrescida de formaldeído foi descartada.

3.4.5.3. Registros dos Resultados

Após a análise dos géis, estes foram secos e arquivados. A secagem foi feita colocando-se o gel entre duas folhas de papel celofane embebidas em água, sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente por um dia, conforme mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Géis de poliacrilamida 10% mostrando a mobilidade eletroforética dos SNPs -238 e -308. A banda de 456 pb é referente ao controle interno da reação (genes da Hemoglobina Humana, iniciadores HBBA.S/HGBA.A). As bandas de 259 pb representam o polimorfismo GA da região promotora -308 do gene TNF.



GG GG AA GG GG GG GG GA GA GA GG

3.4.6. Análise Estatística

Para testar as diferenças entre cada dois grupos de pacientes, foram construídas tabelas 2x2, com a seguinte distribuição:

		Doença		
		Sim	não	Total
Presença de antígeno ou alelo	Sim	A	b	a+b
	Não	C	d	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d

A comparação das distribuições das freqüências alélicas foi realizada pelo teste exato de FISCHER (Graph Pad in Stat, versão 3.0). Todos os alelos foram comparados entre os três grupos pacientes (pacientes com aids e R-CMV, pacientes com aids sem R-CMV) e indivíduos controle.

3.4.6.1 Cálculo dos Valores de Probabilidade (p)

Os valores de probabilidade (**p**) foram obtidos pelo cálculo do *Chi*-quadrado (χ^2), com correção de Yates, ou, quando na tabela 2x2 havia uma casela com valor menor que 5, pelo Teste Exato de Fisher bicaudal. Foram considerados significantes valores iguais ou inferiores a 0,05 (Intervalo de Confiança = 95%) (SIEGEL, 1959).

Quando as diferenças entre os grupos foram significantes ($p \leq 0,05$) realizou-se, também, os cálculos do “odds ratio” (OR), e da Fração Etiológica (FE) ou da Fração Preventiva (FP).

3.4.6.2. Cálculo do "Odds Ratio" (OR)

O cálculo do OR, que permite fazer uma estimativa do Risco Relativo em estudos "caso-controle", foi realizado de acordo com a fórmula:

OR=ad/bc

(HENNEKENS & BURING, 1987).

3.4.6.3. Cálculo da Fração Etiológica (FE)

Quando o OR era maior do que 1, calculou-se a FE, que estima o risco atribuível em termos populacionais, de acordo com a fórmula:

FE= (OR-1/OR) hp;

sendo:

hp = a/a+c,

isto é, a freqüência do alelo nos pacientes (SVEJGAARD, 1986).

3.4.6.4. Cálculo da Fração Preventiva (FP)

Quando o OR foi inferior a 1, calculou-se a FP, indicando que uma determinada especificidade TNF poderia estar diminuída na população de pacientes, sugerindo que esse alelo possa prevenir o desenvolvimento da doença. A FP foi calculada pela seguinte fórmula:

FP= (1-OR)hp / OR(1-hp)+hp

(SVEJGAARD, 1986).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. FREQÜÊNCIAS DOS ALELOS DOS MICROSSATÉLITES DO TNF

As freqüências alélicas dos cinco locos foram testadas, sendo encontrados valores significantes para os alelos de microssatélites TNFa5, TNFb4, TNFb7, TNFc1 e TNFc2, e ainda para os SNPs -308G, -308A, -238G e -238A. Os resultados das tipificações dos microssatélites e dos SNPs -238 e -308 do TNF em pacientes com aids e R-CMV, pacientes com aids sem R-CMV e grupo controle estão nos anexos 4, 5 e 6 respectivamente**.**

Microssatélites da região do TNF

TNFa - Considerando as comparações entre as freqüências dos alelos TNFa entre pacientes com aids total (grupo III) e grupo controle (grupo IV) observamos que o alelo TNFa5 era mais freqüente no grupo III do que no grupo IV (p=0,0308), conferindo OR de 1,849, intervalo de confiança 95% (IC 95%) de 1,059 a 3.227 e uma fração etiológica de 0,0403. Nos pacientes com aids sem R-CMV (grupo II), este alelo também se mostrou mais freqüente quando comparado com o grupo IV (p=0,0146), conferindo OR de 2,038, IC 95% com intervalo de 1,161 a 3,669 e fração etiológica de 0,0500. Quando os pacientes com aids e R-CMV (grupo I) foram comparados com os controles, esse alelo deixou de ser significante (Figura 13).

TNFb - Considerando as freqüências do TNFb, observou-se que o TNFb4 era menos freqüente nos grupos de pacientes com aids e R-CMV (p= 0,040; OR= 0,6020; IC 95% = 0,3751 a 0,9661 e FP = 0,1556), aids sem R-CMV (p= 0,210; OR= 0,6957; IC 95%= 0,5129 a 0,9436 e FP= 0,1190) e nos pacientes com aids do grupo total (p= 0,0074; OR= 0,6730; IC 95%= 0,5063 a 0,8946 e FP= 0,1279) quando comparados com indivíduos do grupo controle (Figura 14).

O alelo TNFb7 foi mais freqüente nos paciente com aids sem R-CMV, do que no grupo controle (p= 0,0358; OR= 2,332; IC 95%= 1,069 a 5,087 e FE= 0,0319). As outras comparações não mostraram resultados significantes.

TNFc - Na comparação entre os grupos de pacientes com aids e R-CMV e aids sem R-CMV, o alelo TNFc1, tinha sua freqüência diminuída (p= 0,0450; OR= 0,6187; IC 95%= 0,3945 a 0,9702 e FP= 0,2591) nos pacientes com aids e R-CMV. A freqüência deste alelo também permaneceu diminuída no grupo de paciente com aids e R-CMV, quando este foi comparado com o grupo controle (p= 0,0144; OR= 0,5739; IC 95%= 0,3688 a 0,8930 e FP= 0,2964).

O alelo do TNFc2 apresentou freqüência aumentada nos pacientes com aids e R-CMV (p= 0,0450; OR= 1,6164; IC 95%= 1,031 a 2,535 e FE= 0,1650) quando comparado com os pacientes com aids sem R-CMV e freqüência aumentada nos pacientes com aids e R-CMV (p= 0,0144; OR= 1,7425, IC 95%= 1,120 a 2,711 e FE= 0,1844), quando comparado com os indivíduos controle (Figura 15).

TNFd e TNFe - Nenhuma associação foi observada entre alelos dos microssatélites TNFd e TNFe e os grupos de paciente com aids R-CMV, aids sem R-CMV, aids total e indivíduos controle (Figura 16 e 17, respectivamente).

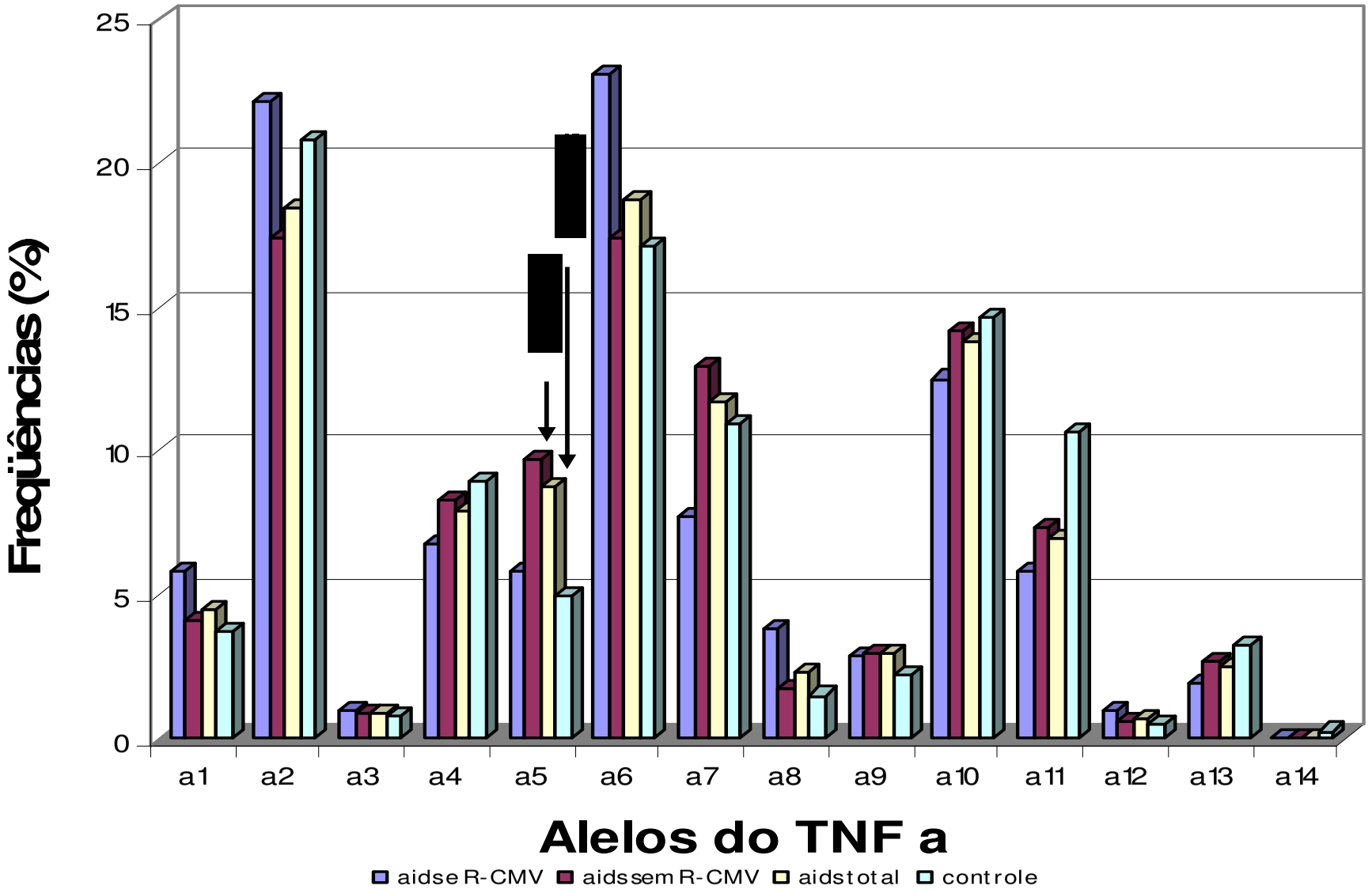


Figura 13 – Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFa

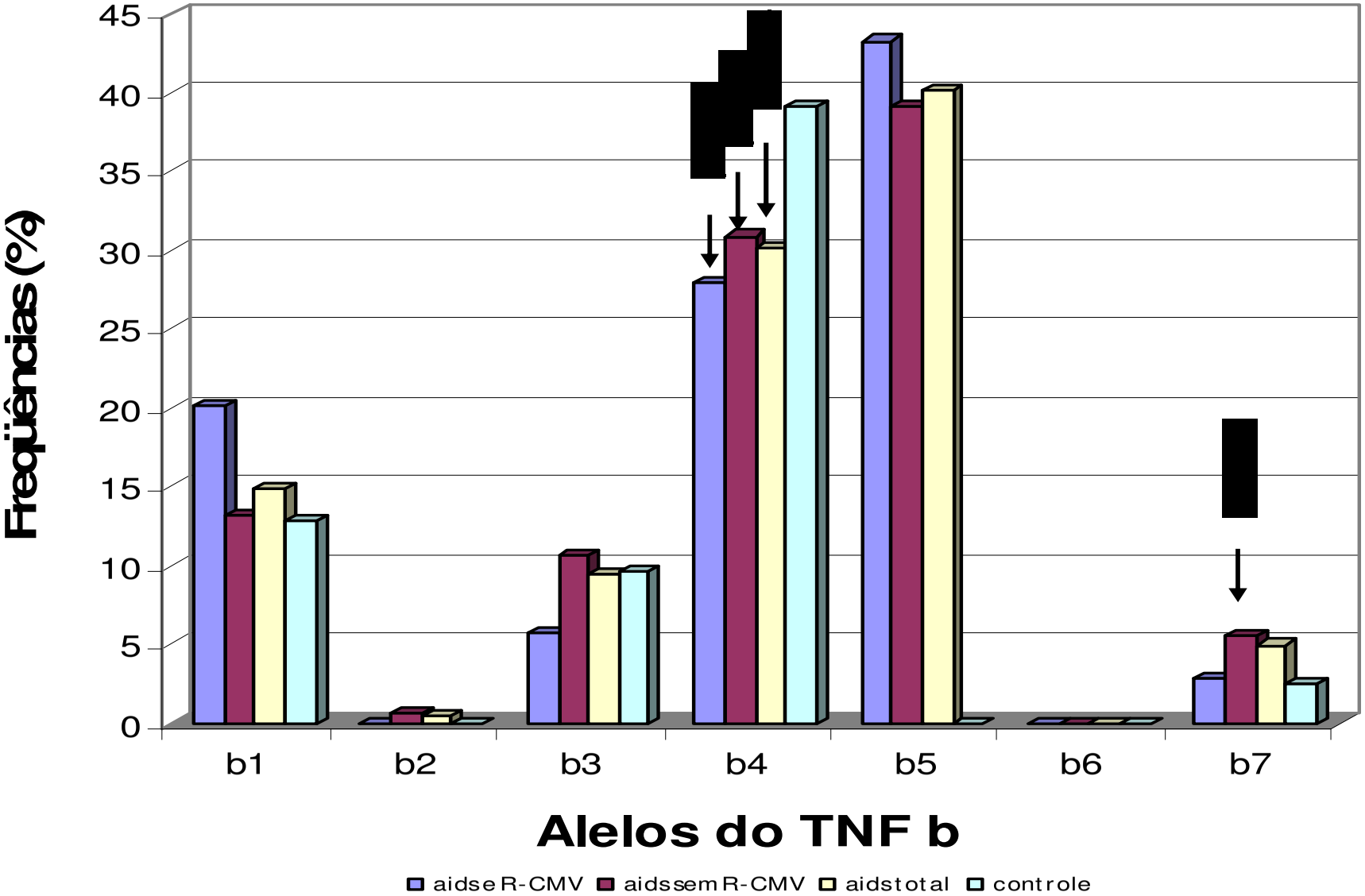


Figura 14 – Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFb

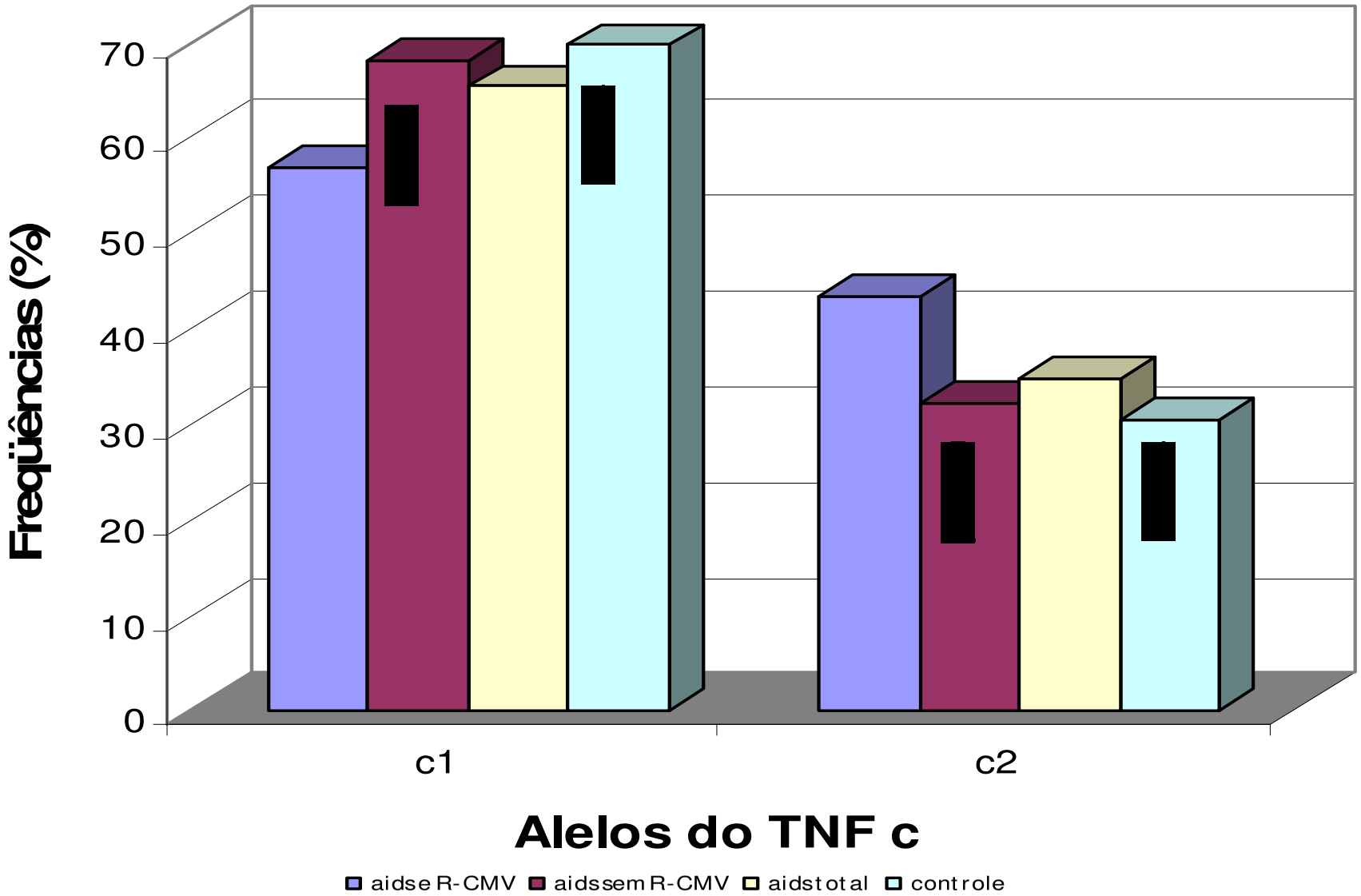


Figura 15 – Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFc

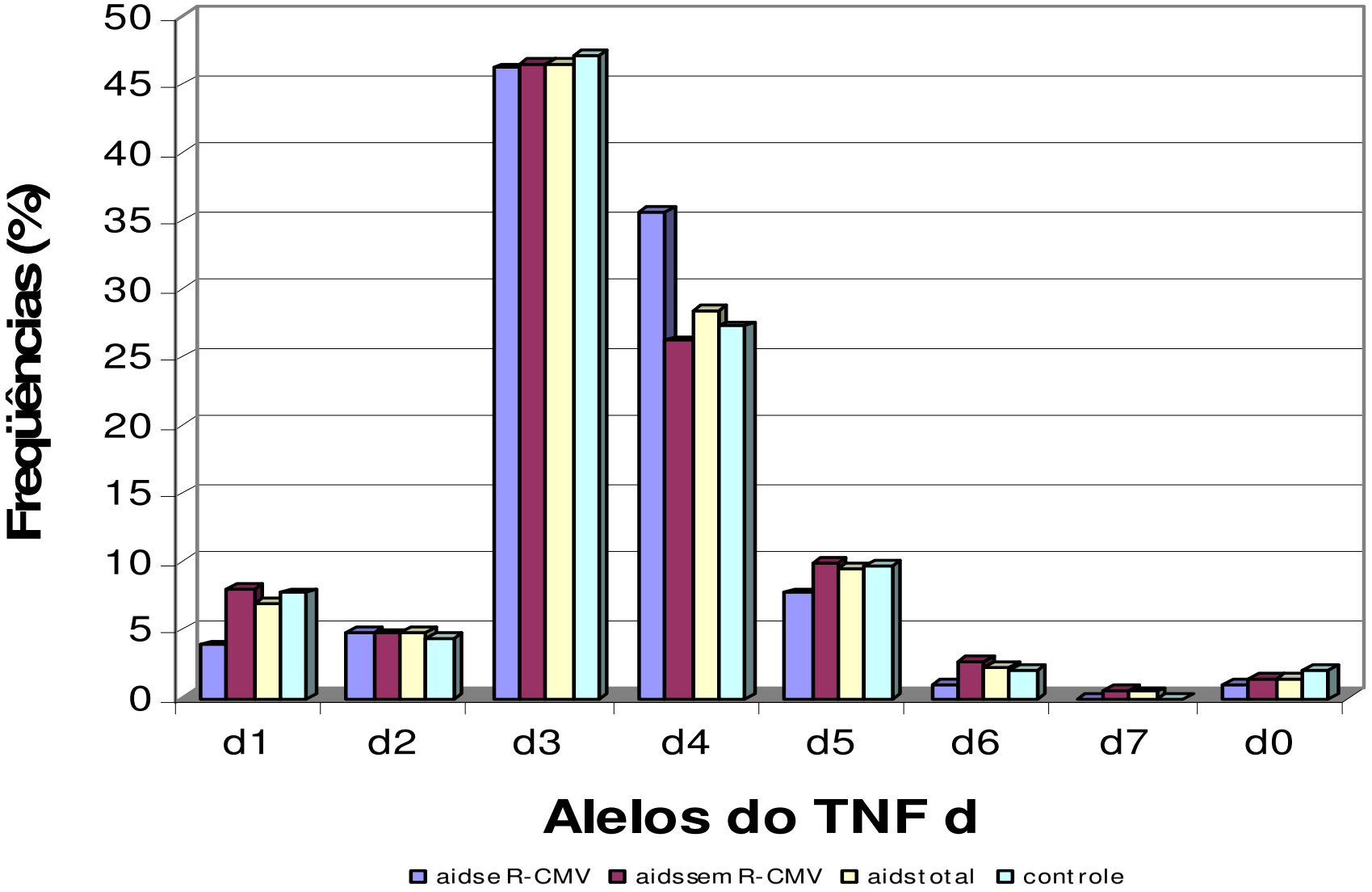


Figura 16 – Distribuição das freqüemcias alélicas para o loco TNFd

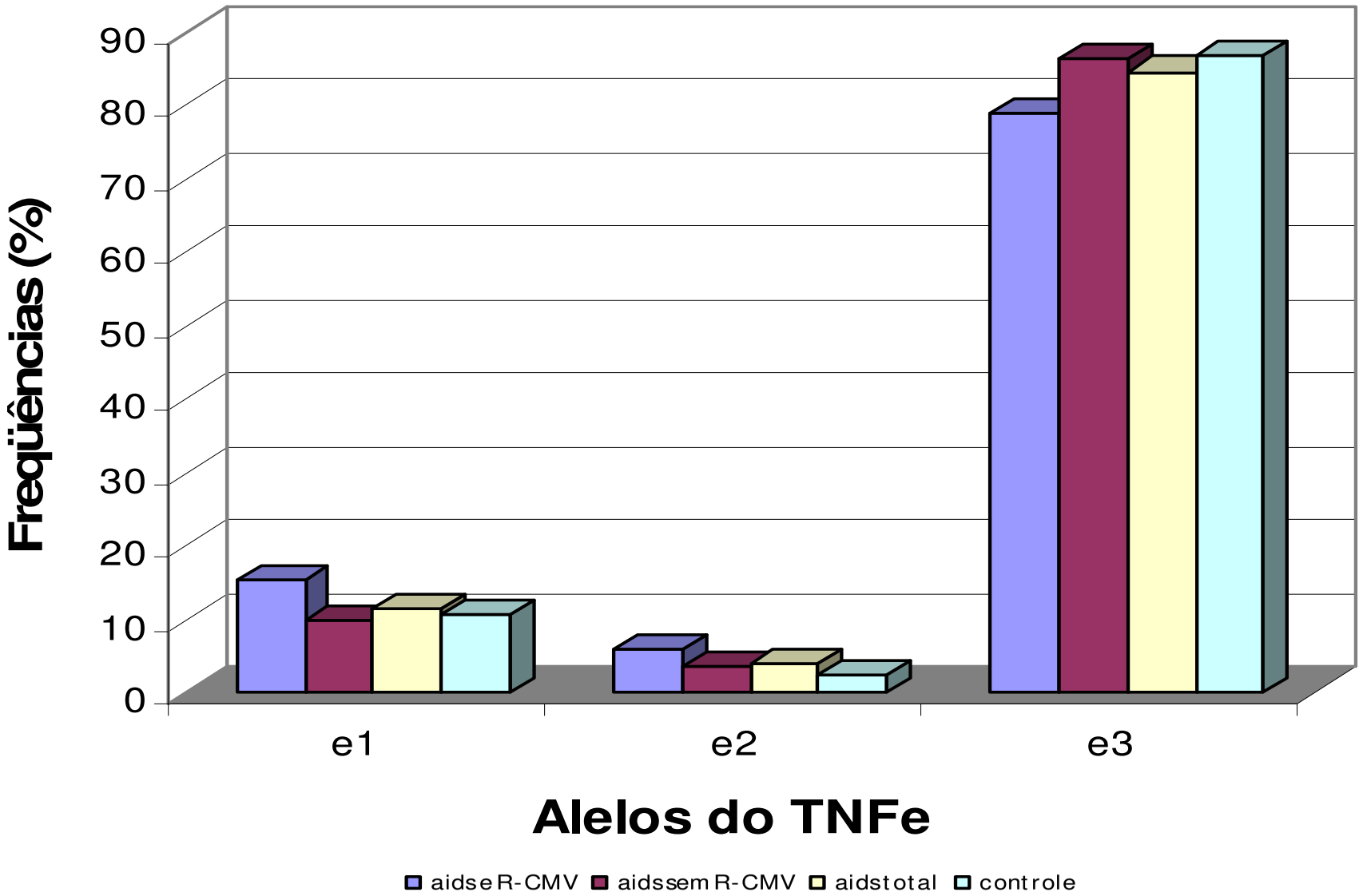


Figura 17 – Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFe

4.2. FREQÜÊNCIAS DOS ALELOS TNF DA REGIÃO PROMOTORA -308 E -238

As tipificações dos polimorfismos dos alelos da região promotora TNF-308 (-308G e -308A), e do TNF-238 (-238G e -238A) foram avaliadas nos grupos de pacientes com aids com e sem R-CMV, aids total e controles saudáveis.

TNF-308G - O alelo foi menos freqüente no grupo de pacientes com aids sem R-CMV (p= 0,0063; OR= 0,5109; IC 95%= 0,3189 a 0,8184 e FP= 0,4504) e nos pacientes com aids do grupo total (p= 0,0187; OR= 0,5725; IC 95%= 0,364 a 0,9020 e FP= 0,3936) quando comparado com os indivíduos controle.

TNF-308A – O alelo foi mais freqüente nos pacientes com aids sem R-CMV (p= 0,0063; OR= 1,9575; IC 95%= 1,222 a 3,136 e FE = 0,0705) e nos pacientes com aids total (p= 0,0187; OR= 1,7468, IC 95%= 1,109 a 2,752 e FE= 0,0558) em relação ao grupo controle (Figura 18)

TNF-238G - O alelo -238G foi menos freqüente no grupo aids e R-CMV do que nos pacientes com aids sem R-CMV (p= 0,0304; OR= 0,4793, IC 95%= 0,2557 a 0,8984 e FP= 0,4732) e também menos freqüente no grupo pacientes com aids e R-CMV em relação aos controles (p= 0,0358; OR= 0,5105, IC 95%= 0,2785 a 0,9358 e FP= 0,4422).

TNF-238A - O alelo -238A foi mais freqüente nos pacientes com aids e R-CMV (p= 0,0304; OR=2,0863, IC 95%= 1,113 a 3,910 e FE= 0,0901), quando comparado com pacientes com aids sem R-CMV. Ainda, o alelo foi também mais freqüente nos pacientes com aids e R-CMV (p= 0,0358; OR= 1,959; IC 95%= 1,069 a 3,591 e FE= 0,0847), quando comparados com os indivíduos controle (Figura 19).

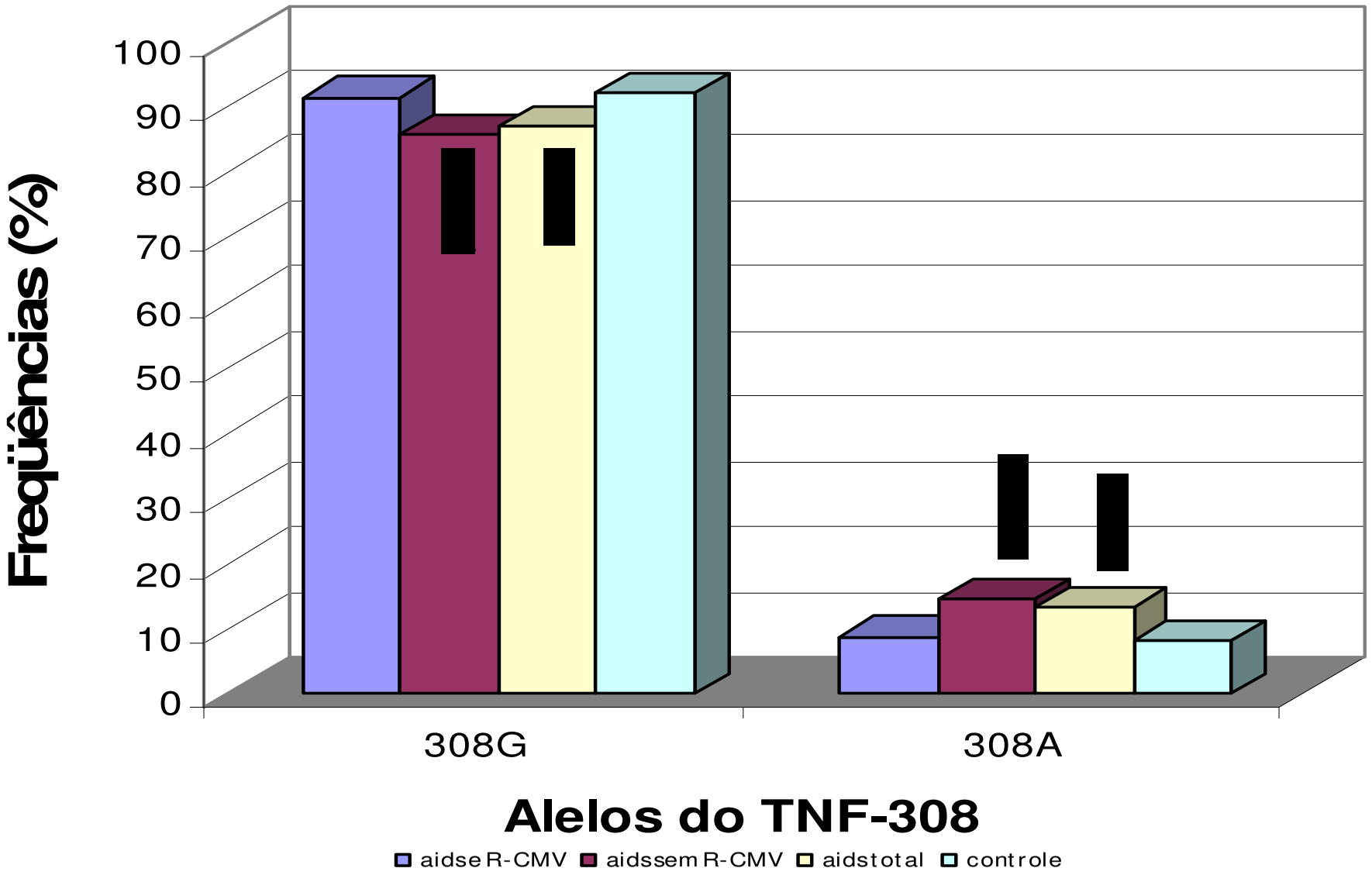


Figura 18 – Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNF-308

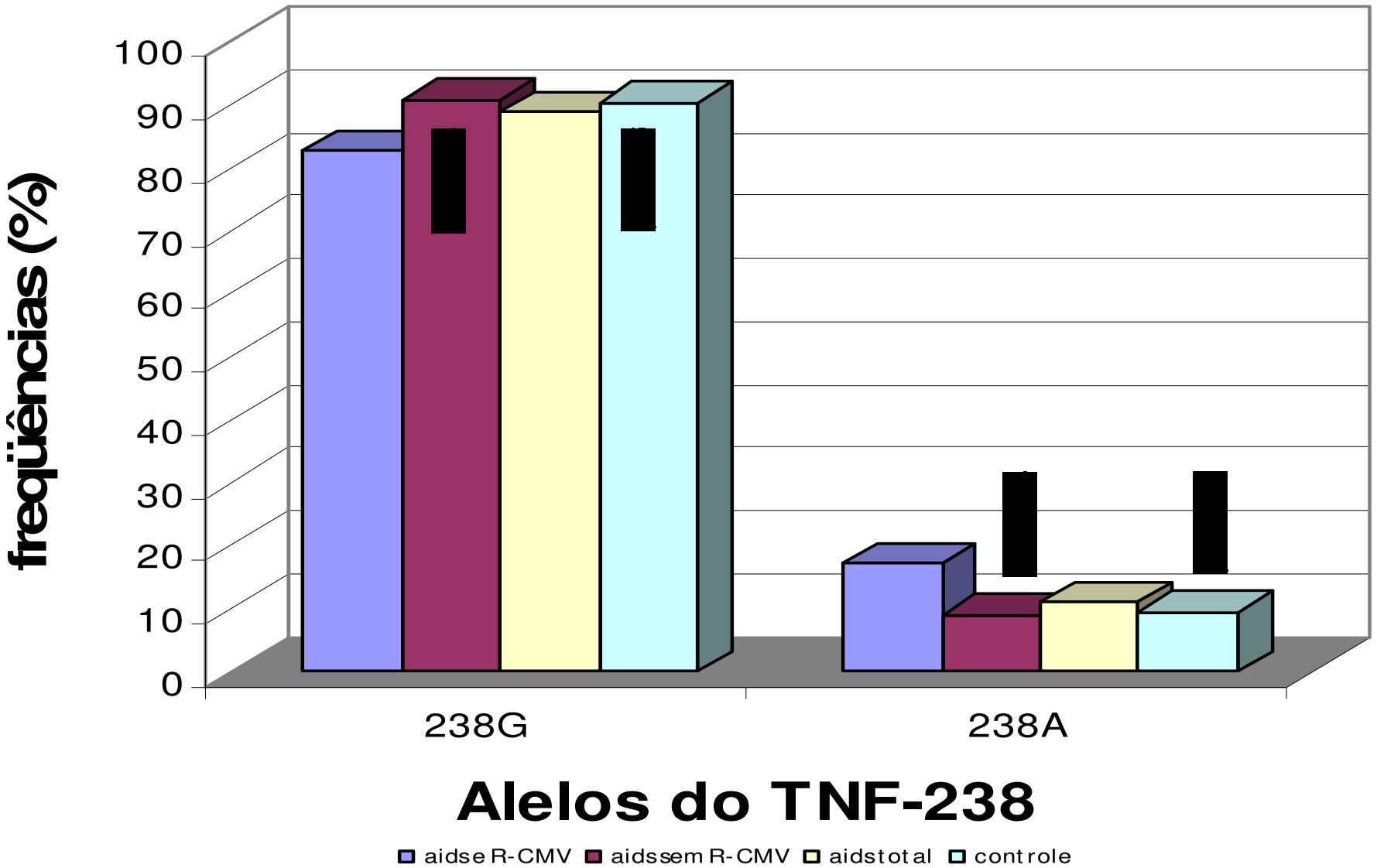


Figura 19 – Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNF-238

Genótipo 308GG - Quando analisamos o genótipo 308GG, observamos que a freqüência deste estava diminuída nos pacientes com aids sem R-CMV (p= 0,0060; OR= 0,4800; IC 95%= 0,2848 a 0,8091; FP= 0,4453), e nos pacientes com aids do grupo total (p= 0,0190; OR= 0,5480; IC 95%= 0,3320 a 0,9047; FP= 0,3871) quando comparamos com o grupo controle.

Genótipo 308GA - O genótipo 308GA foi mais freqüente nos pacientes com aids sem R-CMV (p= 0,0134; OR= 2,015; IC 95%= 1,168 a 3,477 e FE= 0,1156) e nos pacientes com aids do grupo total (p= 0,0380; OR= 1,7692 e FE= 0,0901) quando comparados com o grupo controle (Figura 20).

Genótipo 238GG - Analisando o genótipo 238GG, observamos que nos pacientes com aids e R-CMV sua freqüência estava diminuída quando comparado com os pacientes com aids sem R-CMV (p= 0,0207; OR= 0,4213; IC 95%= 0,2110 a 0,8411 e FP= 0,4732). A freqüência deste permaneceu diminuída nos pacientes com aids e R-CMV (p= 0,0248; OR= 0,4519; IC 95%= 0,2313 a 0,8831 e FP= 0,4422) quando comparado com o grupo controle.

Genótipo 238 GA - O genótipo 238GA teve freqüência aumentada nos pacientes com aids e R-CMV quando comparamos com os pacientes com aids sem R-CMV (p= 0,0207; OR= 2,374; IC 95%= 1,189 a 4,740 e FE= 0,2003) e com o grupo controle (p= 0,0248; OR= 2,213; IC 95%= 1,132 a 4,323 e FE= 0,1897) (Figura 21).

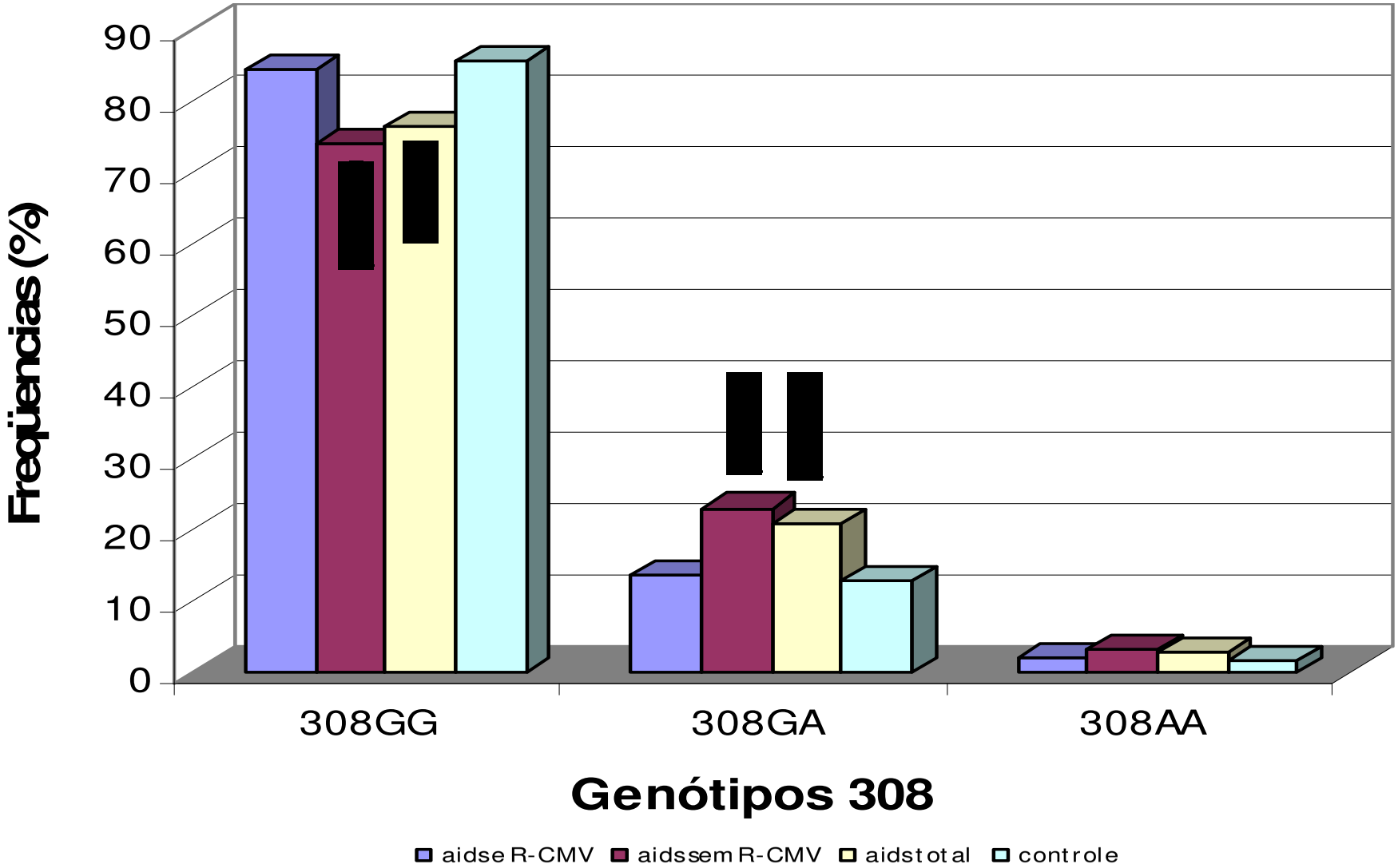


Figura 20 – Distribuição das freqüências genotípicas do TNF-308

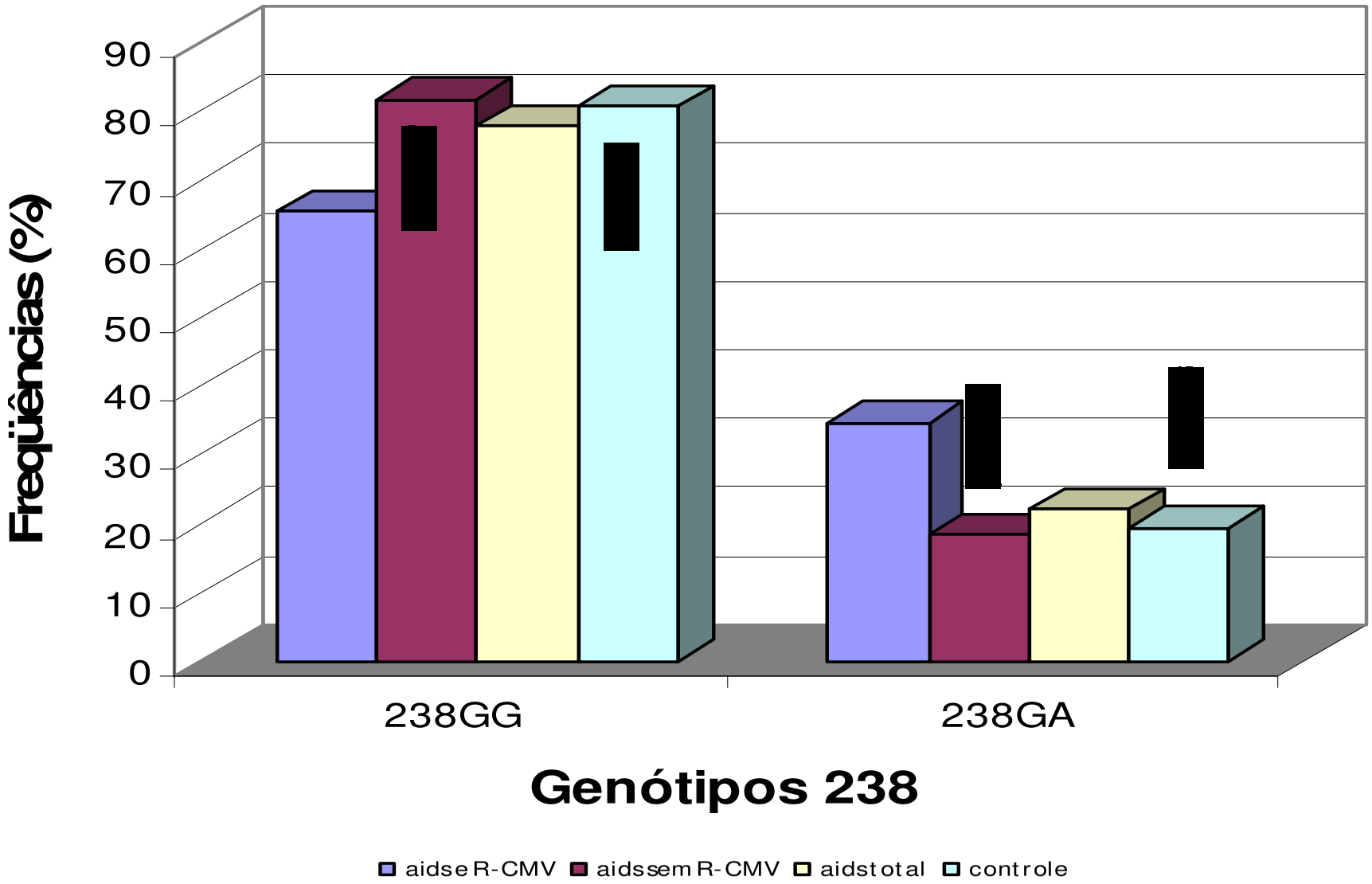


Figura 21 – Distribuição das freqüências genotípicas do TNF-238

4.3. TESTE EXATO DE FISHER

A análise pelo teste de Fisher foi realizada para verificar a associação dos alelos dos microssatélites do TNF e dos SNPs da região promotora do TNF, nas posições -308 e -238, nos pacientes com aids e R-CMV, aids sem R-CMV e aids total. As freqüências alélicas dos sete locos, cinco do TNF e os dois SNPs da região promotora, foram comparadas sendo encontrados valores significantes quando comparamos os grupos de pacientes com aids e R-CMV, aids sem R-CMV e aids total.

As freqüências dos alelos TNFc1, -238G estavam diminuídas no grupo de pacientes com aids e R-CMV quando comparado com os pacientes com aids sem R-CMV. Em contraste, os alelos TNF c2 e -238A estavam mais elevadas no grupo de pacientes com aids e R-CMV, quando comparados com os pacientes com aids sem R-CMV. Os valores de OR, IC 95%, FE, FP conferidos por esses alelos estão mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados das análises estatísticas realizadas acerca das freqüências dos alelos dos microssatélites do TNF quando comparamos os grupos de pacientes com aids e R-CMV e pacientes com aids sem R-CMV.

	P	OR	IC 95%	FE/FP (%)
TNFc1	0,0450	0,6187	0,394-0,970	0,2591
TNFc2	0,0450	1,6164	1,031-2,535	0,1650
TNF-238G	0,0304	0,4793	0,025-0,898	0,4732
TNF-238A	0,0304	2,0863	1,113-3,910	0,0901

Nas comparações entre os grupos de pacientes com aids e R-CMV e indivíduos controles, as freqüências dos alelos TNFb4, TNFc1 e -238G estavam diminuídas no grupo de pacientes com aids e R-CMV, ao passo que, os alelos TNFc2 e -238A mais elevadas nos pacientes com aids e R-CMV. Os valores de OR, IC 95%, FE, FP conferidos por esses alelos estão mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das análises estatísticas realizadas acerca das freqüências dos alelos dos microssatélites do TNF quando comparamos os grupos de pacientes com aids e R-CMV e indivíduos controles.

Alelo	P	OR	IC95%	FE/FP(%)
TNFb4	0,0400	0,6020	0,375-0,966	0,1556
TNFc1	0,0144	0,5739	0,369-0,893	0,2964
TNFc2	0,0144	1,7425	1,120-2,711	0,1844
TNF-238G	0,0358	0,5105	0,278-0,935	0,4422
TNF-238A	0,0358	1,9589	1,069-30591	0,0847

Quando comparamos os grupos de pacientes com aids sem R-CMV e indivíduos controles, as freqüências dos alelos TNFa5, TNFb7 e -308A estavam mais elevadas no grupo de pacientes com aids sem R-CMV, ao passo que as freqüências dos alelos TNFb4 e -308G estavam diminuídas nesses pacientes. Os valores de OR, FE, FP conferidos por esses alelos estão mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Resultados das análises estatísticas realizadas acerca das freqüências dos alelos dos microssatélites do TNF quando comparamos os grupos de pacientes com aids sem R-CMV e indivíduos controles.

Alelo	P	OR	IC95%	FE/FP(%)
TNFa5	0,0146	2,0638	1,161-3,669	0,0500
TNFb4	0,0210	0,6957	0,513-0,944	0,1190
TNFb7	0,0358	2,332	1,069-5,087	0,0319
TNF-308G	0,0063	0,5109	0,318-0,818	0,4504
TNF-308A	0,0063	1,9575	1,222-3,136	0,0705

Quando comparamos os grupos de pacientes com aids total e grupo controle as freqüências dos alelos TNFa5 e -308A estavam mais elevadas no grupo de pacientes com aids total, ao passo que os alelos TNFb4 e -308G estava diminuída nesse grupo de paciente. Os valores de OR, IC 95%, FE, FP conferidos por esses alelos estão mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados das análises estatísticas realizadas acerca das freqüências dos alelos dos microssatélites do TNF quando comparamos os grupos de pacientes com aids total e indivíduos controles.

Alelo	P	OR	IC 95%	FE/FP (%)
TNFa5	0,0308	1,8490	1,059-3,227	0,0403
TNFb4	0,0074	0,6730	0,506-0,895	0,1279
TNF-308G	0,0187	0,5725	0,363-0,902	0,3936
TNF-308A	0,0187	1,7468	1,109-2,752	0,0558

Quando comparamos as freqüências dos genótipos nas posições 308 e 238, observamos que a freqüência do genótipo 308GG estava diminuída nos pacientes com aids sem R-CMV e nos pacientes com aids total quando comparado com o grupo controle, ao passo que a freqüência do genótipo 308GA estava aumentada nos pacientes com aids sem R-CMV e nos pacientes com aids total quando comparado com o grupo controle.

O genótipo 238GG teve freqüência diminuída nos pacientes com aids e R-CMV quando comparado com os pacientes com aids sem R-CMV e com o grupo controle, ao passo que o genótipo 238GA teve freqüência aumentada nos pacientes com aids e R-CMV, quando comparado com os pacientes com aids sem R-CMV e com o grupo controle. Os valores das ORs conferidos por esses genótipos estão mostrados na Tabela 19.

Tabela 19 – Resultados das ORs realizadas acerca das freqüências dos genótipos da região promotora do TNF quando comparamos os grupos de pacientes com aids e R-CMV, pacientes com aids sem R-CMV, pacientes com aids total com o grupo controle.

	308GG	308GA	238GG	238GA
Aids com R-CMV X aids sem R-CMV			0,4213	2,374
Aids com R-CMV X controle			0,4519	2,213
Aids sem R-CMV X controle	0,4800	2,0150		
Aids total X controle	0,5480	1,8427		

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A aids constitui-se uma das principais e mais graves pandemias do século XX e, segundo o Ministério da Saúde do Brasil, existem cerca de 40 milhões de pessoas vivendo com HIV/aids no mundo. Esse número inclui os 4,9 milhões estimados de pessoas que adquiriram o HIV durante 2004. No Brasil, já foram identificados cerca de 433 mil casos de aids (COORDENAÇÃO NACIONAL DE DST E AIDS, 2006).

A infecção pelo HIV-1, quando não tratada, é marcada pelo declínio progressivo das células que compõem o sistema imune, especialmente no número de linfócitos T CD4+ circulantes, o que em um período variável de anos pode ocasionar a morte por falência imune e infecções oportunistas (HAYNES, PANTALEO & FAUCI, 1996).

Apesar das diferenças regionais, as infecções oportunistas de maior prevalência em todos os continentes são a pneumonias causadas pelo *Pneumocystis carinii*, a retinite por citomegalovírus e a encefalite por *Toxoplasma gondii* (BELFORT, 2000).

Manifestações oculares são comuns na aids e cerca de 60% dos pacientes desenvolvem tais manifestações ao longo do curso da doença. O envolvimento ocular na aids, basicamente, compreende: alterações da microcirculação, incluindo exsudatos algodonosos, infecções oportunistas secundárias (por exemplo, citomegalovírus, toxoplasmose, retinites herpéticas, necrose aguda da retina) e tumores, principalmente o sarcoma de Kaposi conjuntival e os linfomas. As alterações neuroftalmológicas são secundárias à lesão do sistema nervoso central (COCHEREAN-MASSIN et al, 1992; BELFORT, 2000). No Brasil, a infecção ocular mais comum em pacientes com aids é a R-CMV, que produz deteriorização da retina com marcada diminuição da acuidade visual se acometer a parte central da retina (JABS et al, 1989; MUCCIOLI et al, 1994 CURRI et al, 1999; e DUALIBY et al, 1999).

Desde a introdução da HAART, tem havido um decréscimo na incidência do diagnóstico da aids, de infecções oportunistas, incluindo a R-CMV, e ainda, da mortalidade entre pacientes infectados com o HIV-1 (PALELLA et al, 1998; KEMPEN et al, 2006). Ainda, com advento da HAART, a incidência da R-CMV e o risco da perda visual devido à retinite e ao descolamento de retina diminuíram, no entanto, a R-CMV

permanece a principal causa de morbidade ocular em pacientes com aids (HOLBROOK et al, 2003; JABS, 2004). Apesar dos esforços para conter a evolução fatal da aids, tem-se observado a ocorrência de resistência viral aos medicamentos disponíveis (KANTOR et al, 2004). Uma das possibilidades para tentar explicar esta resistência se deve às diferenças individuais que promovem susceptibilidade para a R-CMV (SCHRIER et al., 1995; PRICE et al., 2001; FERNANDES et al., 2003 RODRIGUES et al., 2003).

Diversos relatos têm demonstrando a contribuição do polimorfismo de genes que codificam citocinas na susceptibilidade ou gravidade de vários grupos de doenças, sendo o TNF particularmente importante (POCIOT et al., 1993; DERKX et al., 1995; TURNER et al., 1995; HAJEER et al., 2001; WARLE et al., 2003; SOOKOIAN et al., 2005).

O gene do TNF está localizado na região de classe III do CPH, no cromossomo 6p21, e apresenta forte ligação de desequilíbrio com certos alelos da região I e II do CPH, formando haplótipos (HAJEER et al., 2001). Associações são importantes nos mecanismos de indução das respostas imunológicas, visto que a molécula HLA é importante para a ligação de peptídeos antigênicos e sua apresentação para linfócitos T. O TNF é uma importante citocina pró-inflamatória relacionada a respostas imunológicas, seja infecciosa ou auto-imune, e em mecanismos metabólicos (HAJEER & HUTCHINSON, 2001; SKOOG et al., 2001). A relação entre os polimorfismos com algumas patologias pode ser devida à influência direta da variabilidade genética sobre a expressão gênica, ao desequilíbrio de ligação dos genes de citocina com genes adjacentes, ou ainda, influência de outros genes, situados em outros cromossomos, agindo epistaticamente.

A produção do TNF pode estar associada com as influências do polimorfismo de regiões promotoras e dos microssatélites encontrados na região do TNF, estando ou não em desequilíbrio de ligação com os alelos de classe I e II, tanto em doenças auto-imunes, doenças infecciosas, infecções parasitárias e transplantes (HAJEER; HUTCHINSON, 2001). Marcadores genéticos tipo microssatélites tem sido usados como ferramentas neste tipo de análise.

Em relação aos polimorfismos de microssatélites da região do TNF e sua produção *in vitro*, nem todos os alelos foram analisados. Em pacientes com diabetes melitus insulino dependente, os alelos TNFa2 e TNFc2 têm sido associados com elevada produção de TNF, enquanto que os alelos TNFa6 e TNFc1 com baixa produção de TNF (POCIOT et al., 1993). Por outro lado, DERKX et al., (1995) mostraram que os alelos TNFa2, TNFa6 e TNFa10 estão associados com a baixa produção de TNF, enquanto que os alelos TNFa4 e TNFa6 estão associados com a alta produção desta citocina. Em doenças, aumento significante da freqüência do alelo TNFa2 tem sido observado em pacientes com LES (STURFELT et al., 1996, HAJEER et al., 1997), na doença celíaca (MACMANUS et al., 1996), na arterite de células gigantes (MATTEY et al., 2000), e ainda, nos pacientes com artrite idiopática juvenil (grupo total e as formas oligo e policiarticular) (ZAKE et al., 2002).

Embora o genótipo TNF possa influenciar na reposta do hospedeiro às infecções virais, incluindo neutralização e eliminação dos vírus (HAJEER; HUTCHINNSON, 2000; HOHLER et al., 1998), existem poucos estudos avaliando essa associação em pacientes com aids. Assim, a taxa de deterioração imunológica e progressão para aids diferem entre os indivíduos infectados portadores do HIV-1. Esta progressão pode ser influenciada pelo fenótipo do vírus, pela resposta imune do hospedeiro e por fatores genéticos. Posto que o TNF esteja envolvido na patogenia da aids e, que os microssatélites possam estar implicados na magnitude de expressão do TNF, podendo servir como marcadores de doença, neste estudo, avaliamos o polimorfismo de cinco microssatélites do TNF e dois SNPs da região promotora do TNF, as posições -238 e -308, analisando a associação dos microssatélites no desenvolvimento da R-CMV em pacientes com aids ou como marcadores genéticos para aids *per se*.

A freqüência do alelo TNFa5 apresentou-se aumentada nos pacientes com aids sem R-CMV (9,71% versus 4,95%; p= 0,0146; OR= 2,0638) e também nos pacientes do grupo III, aids total, (8,78% versus 4,95%, p= 0,0308; OR= 1,8489), quando comparados com o grupo controle. Posto que a freqüência desse alelo em pacientes com aids e R-CMV era semelhante àquelas observadas em indivíduo controle, podemos inferir que o alelo TNFa5 confere susceptibilidade ao desenvolvimento da aids, independentemente da presença da retinite.

O alelo TNFb4 estava diminuído nos pacientes com: aids e RCMV (27,88% versus 39,11%; p= 0,0400; OR= 0,6020), aids sem R-CMV (30,88% versus 39,11%, p= 0,0210, OR= 0,6957), e ainda, nos pacientes com aids do grupo total (30,18% versus 39,11%; p= 0,0074; OR= 0,6730) em comparação com os indivíduos do grupo controle. Posto que a freqüência desse alelo nos três grupos de pacientes estava diminuída quando comparado com o grupo controle, podemos inferir que o alelo TNFb4 confere proteção contra o desenvolvimento da aids. Por outro lado, o alelo TNFb7 teve freqüência aumentada somente nos pacientes com aids sem R-CMV (5,59% versus 2,48%; p= 0,0358; OR= 2,3320) quando comparado com o grupo controle. Posto que esse alelo não apresentou alteração de freqüência nos pacientes com aids do grupo total, estudos posteriores serão necessários para verificar se este alelo possa estar envolvido como fator de susceptibilidade ao desenvolvimento da aids. Não encontramos relatos acerca do papel dos microssatélites TNFb4 e TNFb7 na magnitude de produção de TNF. Além disso, não existem estudos na literatura acerca da associação do microssatélite TNFb com aids, no entanto, em doenças auto-imunes, Hajeer et al, (1997) mostraram que em indivíduos caucasianos do Reino Unido o alelo TNFb1 estava associado com LES. Esse alelo também tem sido associado com esclerose múltipla (ROTH et al., 1994).

Na região do microssatélite TNFc, o alelo TNFc1 encontrou-se diminuído nos pacientes com aids e R-CMV (56,73% versus 67,94%; p= 0,0450; OR= 0,6187) quando comparado com pacientes com aids sem R-CMV e nos pacientes com aids e R-CMV (56,73% versus 69,55%; p= 0,0144; OR= 0,5739) quando comparado com indivíduos controle, sugerindo ser este alelo um fator de proteção para o desenvolvimento da retinite por citomegalovírus. Por outro lado, o alelo TNFc2, em nosso estudo, mostrou-se associado com a susceptibilidade ao desenvolvimento da R-CMV, pois o alelo estava aumentado nos pacientes com aids e R-CMV quando comparamos com os pacientes com aids sem R-CMV (43,27% versus 32,06%; p= 0,0450; OR= 1,6164) e com indivíduos controle (43,27% versus 30,45%; p= 0,0144; OR= 1,7425). A freqüência do TNFc2 embora fosse maior nos pacientes com aids total quando comparado com o grupo controle não foi estatisticamente significante. O alelo TNFc2 tem sido mostrado apresentar forte diferença entre a média de progressão da infecção pelo HIV, sendo

elevada em pacientes que apresentavam uma progressão mais lenta (60,9%) e menor naqueles com progressão mais rápida (15%) da doença (p=0,002; OR= 0,1). Baixa freqüência desse alelo também foi observada no grupo de pacientes apresentando progressão mais rápida da infecção pelo HIV em comparação com grupo controle saudável (15% versus 45,9%, p= 0,006) (KHOO et al., 1997).

Neste estudo, não foram observadas associações significantes entre alelos do microssatélite TNFd com susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da retinite por citomegalovírus ou aids. Por outro lado, a tipificação do TNFd tem sido estudada em diversas doenças mediadas por mecanismos imunológicos. Assim, o alelo TNFd2 apresentou aumento significante em pacientes com LES, apresentando fotossensibilidade (38% versus 16%) e síndrome de Raynaud (39% versus 16%) quando comparados com o grupo controle, porém, esse alelo não apresentava aumento significativo em sua freqüência quando comparados o grupo de pacientes com lúpus manifestando envolvimento renal com o grupo controle (31% versus 16%), o alelo TNFd2 também não apresentava aumento significativo no grupo de pacientes com lúpus que eram negativos para os auto-anticorpos anti-Ro e anti-La quando comparados com o grupo controles (27% versus 16%) (HAJEER et al, 1997). O TNFd3, quando em homozigose, tem sido associado a elevado nível de mortalidade e com a doença do enxerto versus hospedeiro em receptores de transplante de medula óssea (CAVET *et al.,* 1999). No LES o alelo TNFd3 estava associado com a doença em pacientes caucasianos do Reino Unido (HAJEER et al, 1997b). Segundo Turner et al (1995), o alelo TNFd3 está associado com elevada produção de TNF por células do sangue total estimuladas por endotoxina. Em outras doenças, MATTEY et al. (2000) relataram que a freqüência do alelo TNFd4 estava diminuída em pacientes apresentando polimialgia reumática quando comparados aos controles (33,8% versus 52,9%; OR= 0,5; *p*= 0,00025). Já em pacientes que sofreram transplante renal a freqüência do alelo TNFd4 foi significantemente menor no grupo que apresentou rejeição do que no grupo sem apresentar rejeição (OR, p) (ASANO et al., 1997). Por outro lado, elevado risco de desenvolver a doença do enxerto versus hospedeiro quando pacientes ou doadores relacionados de células tronco apresentavam o alelo TNFd4 foi mostrado através do trabalho de NORDLANDER et al. (2002). Na artrite

reumatóide esse alelo não estava associado com a doença (*p*= 0,09) (MULCAHY et al.(1996). Não existem citações acerca da associação desses alelos com a magnitude de secreção do TNF.

Na região do microssatélite TNFe, também não foi observada associação entre alelos do TNFe com susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da R-CMV. Não existe citação acerca da associação desse alelo com a magnitude de secreção do TNF.

De maneira distinta aos microssatélites, muitos estudos têm sido conduzidos para avaliar o polimorfismo da região promotora do gene TNF (nas posições -308 e -238), sendo bem reconhecida à participação desses sítios polimórficos em associação com a magnitude de produção do TNF *in vitro*. Embora resultados conflitantes sejam descritos, a maioria dos estudos descreve que os genótipos TNF-308AA ou 308GA estão associados com a alta produção de TNF (POCIOT et al., 1993; BOUMA et al., 1996; LOUIS et al., 1998; PELLETIER et al., 2000; TAMBUR et al., 2001; REVIRON et al., 2001), ao passo que o genótipo -308GG esteja associado com baixa produção da citocina.

Neste estudo, os resultados mostram que a freqüência do alelo TNF-308G está diminuída nos grupos de pacientes com aids sem R-CMV (85,59% versus 92,08%; p = 0,0063; OR= 0,5109) e nos pacientes com aids total (86,94% versus 92,08%; p= 0,0187, OR= 0,5725) quando comparamos com o grupo controle. Posto que a freqüência do alelo esteja diminuída nos pacientes com aids sem R-CMV e nos pacientes com aids total, podemos inferir que o alelo TNF-308G confere proteção ao desenvolvimento da aids. Quando analisamos o genótipo TNF-308 GG observamos que este tinha freqüência diminuída nos pacientes com aids sem R-CMV (74,12% versus 85,64%; p= 0,0060; OR= 0,4800) e nos pacientes com aids do grupo total (76,58% versus 85,64%; p= 0,0190; OR= 0,5480), comparado com o grupo controle, sugerindo este ser um marcador de proteção para o desenvolvimento da aids, de forma semelhante ao alelo TNF-308G.

A freqüência do alelo TNF-308A estava aumentada nos pacientes com aids sem R-CMV (14,41% versus 7,92% p= 0,0063; OR= 1,9575) e nos pacientes com aids total (13,06% versus 7,92% p= 0,0187; OR= 1,7468) quando comparado com o grupo controle, sugerindo assim que este alelo esteja relacionado com a susceptibilidade à

aids. Analisando o genótipo TNF-308GA, observamos que este estava aumentado nos pacientes com aids sem R-CMV (22,94% versus 12,87%; p= 0,0134; OR= 2,015) e nos pacientes com aids do grupo total (20,72% versus 12,87%; p= 0,0380; OR= 1,7692), sugerindo ser este um genótipo de susceptibilidade ao desenvolvimento da aids, semelhantemente aos alelos TNF-308A.

O gene da região promotora do TNF na posição -238 também foi avalido e observamos que o alelo TNF-238G estava diminuído nos pacientes com aids e R-CMV (82,69% versus 90,88% p= 0,0304; OR= 0,4793) quando comparado com pacientes com aids sem R-CMV e diminuído também quando esse grupo de pacientes foi comparado com grupo controle (82,69% versus 90,35%; p= 0,0358; OR= 0,5105). Posto que o alelo TNF-238G esta diminuído nos pacientes com aids e R-CMV, sugerimos que este alelo confere proteção ao desenvolvimento da retinite pelo citomegalovírus nos pacientes com aids. O genótipo TNF-238GG mostrou-se diminuída nos paciente com aids e R-CMV (65,38% versus 81,76%; p= 0,0207; OR= 0,4213), quando comparado com pacientes com aids sem R-CMV e quando comparado com o grupo controle (65,38% versus 80,69%; p= 0,0248; OR= 0,4519), mostrando ser este genótipo um fator que protege contra o desenvolvimento da retinite nos pacientes com aids, semelhantemente ao alelo TNF-238G.

O alelo TNF-238A teve freqüência aumentada nos pacientes com aids e R-CMV quando comparamos estes com o grupo de pacientes com aids sem R-CMV (17,31% versus 9,12%; p= 0,0304; OR= 2,0863) e com o grupo controle (17,31% versus 9,65%; p= 0,0358; OR= 1,9589). Posto que o alelo TNF-238A estava aumentado nos pacientes com aids e R-CMV, inferimos que esse alelo possa estar associado ao desenvolvimento da retinite em pacientes com aids. A análise do genótipo do TNF-238GA mostrou-se aumentada nos pacientes com aids e R-CMV (34,62% versus 18,24; p= 0,0207; OR= 2,374) quando comparado com os pacientes com aids sem R-CMV e com o grupo controle (34,62% versus 19,31; p= 0,0248; OR= 2,213), conferindo este genótipo susceptibilidade à retinite, de forma semelhante ao alelo -238A.

Sumariando, quando consideramos as comparações das freqüências dos alelos dos microssatélites da região do TNF entre o grupo total de pacientes com aids e os controles, observamos que o alelo TNFb4 conferiu proteção ao passo que os alelos

TNFa5 susceptibilidade ao desenvolvimento da aids. Estratificando o grupo total de pacientes com aids em pacientes portadores do HIV-1 que desenvolveram a R-CMV e os pacientes com aids que não desenvolveram R-CMV, observamos que o alelo TNFb4 além de ser marcador de proteção para a aids também conferiu proteção para o desenvolvimento da R-CMV. O alelo TNFc1 conferiu proteção ao passo que o alelo TNFc2 susceptibilidade para o desenvolvimento da retinite nos pacientes com aids.

Quando consideramos as comparações dos alelos da região promotora, os genes do TNF nas posições -308 e -238 observamos que o alelo TNF-308G conferiu proteção ao passo que o alelo TNF-308A susceptibilidade para o desenvolvimento da aids. Quando estratificamos os pacientes com aids, verificamos que o alelo TNF-238G conferiu proteção ao passo que o alelo TNF-238A susceptibilidade para o desenvolvimento da retinite em pacientes portadores do HIV-1.

Embora os mecanismos relacionados com a participação do TNF no desenvolvimento da R-CMV não estejam bem esclarecidos, este estudo sugere que fatores imunogenéticos associados com a magnitude de expressão do TNF e, provavelmente da expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, estejam envolvidas no desenvolvimento da R-CMV em pacientes com aids, sendo que estudos posteriores serão necessários para complementar os achados deste estudo. Este é o primeiro a avaliar a associação dos microssatélites da região do TNF com a aids e com pacientes portadores do HIV-1 com R-CMV.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. Quando considerados os pacientes com aids como um todo, dois alelos (TNFb4 e TNF-308G) estavam associado com proteção e dois alelos (TNFa5 e TNF-308A) com a susceptibilidade para o desenvolvimento da aids:

6.2. Quando os pacientes foram estratificados em pacientes com aids e R-CMV e pacientes com aids sem R-CMV, os alelos TNFb4, TNFc1, TNF-238G estavam associados com proteção e os alelos TNFc2 e TNF-238A ao desenvolvimento da retinite em pacientes com aids;

6.3. Este é o primeiro trabalho avaliando as freqüências dos microssatélites da região do TNF em pacientes com aids, sendo possível identificar marcadores de proteção e de susceptibilidade para o desenvolvimento da aids e também da R-CMV nos pacientes portadores do HIV-1, sugerindo que esses alelos possam modular a magnitude de expressão da citocina e ocasionar o aparecimento da retinite em pacientes HIV-1 portadores do citomegalovírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER SP- Transfusion-associated Cytomegalovirus infections. **Rev. Infect. Dis. 5**: 977, 1983.

AGGARWAL BB, SAMANTA A, FELDMANN M. TNF α. In: Cytokine Reference**. Academic Press.**p: 413-433, 2000.

ARTLETT CM, SMITH JB, JIMENEZ AS. New perspectives on the etiology of systemic sclerosis. **Molecular Medicine Today**, 1999, 74-78.

ASANO H, KOBAYASHI T, UCHIDA K, et al. Significance of tumor necrosis factor microsatellite polymorphism in renal transplantation. **Tissue Antigens 50,** 1997.

BELFORT JR R & MUCCIOLI C. Experience of HIV/AIDS and the eye in Brazil, South America. **Commun Eye Health 8**: 26-27, 1995.

BELFORT Jr R. The ophthalmologist and the global impact of the AIDS epidemic LV Edward Jackson Memorial Lecture. **Am J Ophthalmol., 129:** 1-8, 2000.

BENSON JWT, BODDEN SJ & TOBIN JOH. – Cytomegalovirus and blood transfusion in neonates. **Arch. Dis. Childh**. **54**: 538, 1979.

BETTS RF. - Syndrome of Cytomegalovirus infection. **Advances in Int. Med. 26**:47, 1980.

BOUMA G, CRUSIUS JB, OUDKERK POOL M, KOLKMAN JJ, VON BLOMBERG BM, KOSTENSE PJ, GIPHART MJ, SCHREUDER GM, MEUWISSEN SG, PENA AS. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. **Scand J Immunol. Apr;43(4):** 456-63, 1996.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. **AIDS in Brazil. A joint government and society endeavour.** XI International AIDS Conference. Geneva, 95p.,1988.

CABAU N. - Seroepidemiology of Herpes Virus hominis and Cytomegalovirus infection in the first years of life. Arch, franc. **Red**. 37:1,1980.

CARLSTROM G, ALDEM J, BELGRAGE S, HEDESTROM G, HOLMBERG L, NORDBRING F & STERNER G. Acquired cytomegalovirus infection. **BMJ 2**: 521-525, 1968.

CARRASCO-FONT C, GONZALES-GUIJARRO J, SUARES DE FIGUEROA, M, ANTELA J, ANDREU D, TUIZ BILBAO S, SIRERA GT, ESPAÑA E, DIAS-LLOPIS M, FERRER NOVELLA E, TORRON C, TAÑA P, MARTINEZ M , BELMONT J & COLUNGA M. Estudio multicéntrico español sobre retinitis por citomegalovírus en pacientes con SIDA. **Arch SocEspOftalmol 69**:563-570,1965.

CASSOU N, LUMBROSO L, BODAGHI B, ZAZOUN L, KATLAMA C & LE HOANG P. Cystoide macular edema and cytomegalovirus retinitis in patients with HIV disease treated with highly active antiretroviral therapy. **Br J Ophthalmol 83**: 47-49, 1999.

CAVETJ, MIDDLETON PG, SEGALL M,NOREEN H, DAVIES SM, DICKINSON AM. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphism associated with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. **Blood, 94:** 3941, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Kaposi's sarcoma and pneumonia among homosexual man in New York City and California. **MMWR – CDC 25**: 303-308, 1981.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR - CDC 42**: 1-13, 1993.

CHENG L, RAO NA, KEEF KS, AVILA JR CP, McDONALD JC & FREEMAN WR. Cytomegalovirus iritis. **Ophthalmic Surg Lasers 29**: 930-932, 1999.

Coordenação Nacional de DST e AIDS. Dados e pesquisa em DST e AIDS [online]. **Ministério da Saúde**; 2006 Disponíveis em: URL: http://www.aids.gov.br.

COCHEREAN-MASSIN I, LE HOANG P, LAUTIER-FRAU M, ZERDOUN E, ZAZOUN L, ROBINET M, et al. Ocular toxoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected patients. **Am J Ophthalmol., 114:**130-5,1992.

CURI ALL, MURALHA NETO A, MURANAKA E, MURALHA L, VIANNA RNG. Estudo epidemiológico das alterações oftalmológicas na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. **Rev Bras Oftalmol. 58(3):** 223-6, 1999.

DERKX HHF, BRUIN CV, JONGNEEL LP, et al. Familial differences in endotoxin-induced TNFrelease in whole blood mononuclear cells in vitro: relationship to TNF gene polymorphism. **J Endotoxin, 2:** 19, 1995.

DOAN S, BADEON I & CHAINE G. Course of cytomegalovirus retinitis in HIV positive patients treated with triple antiretroviral therapy. **J Fr Ophthalmol 21**: 34-41, 1998.

DOERR, H.W.: BRAUN, R. & MUNK, K. - Human Cytomegalovirus infection. **Recent. Developments in Diagnosis and Epidemiology 63**:241,1985.

DUALIBY PT, SULEIMAN JMAH. Achados oculares em AIDS no Instituto de Infectologia Emílio Ribas antes da introdução das drogas inibidoras de protease. **Rev Bras Oftalmol. 58(5):** 383-7, 1999.

FERNANDES AP, GONÇALVES MA, ZAVANELLA RB, et al. HLA markers associated with progression to AIDS are also associated with susceptibility to cytomegalovirs retinits. **AIDS, 17:** 2133-6, 2003.

FIGUEIREDO JFC, RODRIGUES MLV, SOUZA NV, ROMÃO E & KRIEGER FTS. Aspectos da aids de interesse para o oftalmologista. **Medicina, Ribeirão Preto 31:** 577-583, 1998.

FRIEDMAN, H.M. - Cytomegalovirus: subclinical infection or disease? **Amer. J. Med.70:** 215, 1981.

GALLAGHER G, LINDEMANN M, FERENCIK S, WALZ MK, SCHMITZ A, RICHARDS S, ESKDALE J, FIELD M, GROSSE-WILDE H. Association of the TNFa2 microsatellite allele with the presence of colorectal cancer. **Tissue Antigens, 50(1):** 47-51, 1997.

GOLDBERG DE, WANG H, AZEN SP, FREEMAN WR. Long term visual outcome of patients with cytomegalovirus retinitis treated with highly active antiretroviral therapy. **Br J Ophthalmol87:** 853-5, 2003.

GOLDMAN RL, BANK EW & WARNER NE – Cytomegalovirus infection of the cervix: an "incidental" finding of possible clinical significance. Report of a case. **Obstet & Gynec.34:** 326, 1969.

GRIFFITHS PD, ESTAGNO S, PASS RF, SMITH, RJ & ALFORD CA. Infection with cytomegalovirus during pregnancy: specific IgM antibodies as a Cytomegalovirus retinitis as the initial manifestation of the acquired immune deficiency syndrome. **Am J Ophthalmol103:** 316-20, 1987.

HAJEER AH.; WORTHINGTON J., SILMAN AJ, OLLIER WE. Association of tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms with HLA-DRB1*04-bearing haplotypes in rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Rheum,39:** 1109, 1996.

HAJEER AH, WORTHINGTON J, DAVIES EJ, HILLARBY MC, POULTON K, OLLIER WE. TNF microsatellite a2, b3 and d2 alleles are associated with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens49:** 222, 1997.

HAJEER A H & HUTCHINSON IV. TNF-α Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications. **Microscopy Research and Technique, 50:** 216-228, 2000.

HAJEER AH & HUTCHINSON IV. Influence of TNF-alpha gene polymorphism on TNF Production and disease. **Human Immunology, 62:** 1191-1199, 2001.

HAYNES BF, PANTALEO G, FAUCI AS. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. **Science 271(5247):** 324-8, 1996.

HENDERLY DE, FREEMAN WR, SMITH RE, CAUSEY D & RAO NA. Cytomegalovirus retinitis. **Surv Ophthalmol34:** 193-203, 1987.

HENLE S. - Antibody responses to the Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus after open-heart and other surgery. **N. Engl. J. Med. 282:** 1.082,1970.

HENNEKENS CH & BURING JE. **Epidemiology in medicine**. Boston/Toronto, Little Brown,p.54-100, 1987.

HERBORT CP & CHAVE JP. Cicatrisation of cytomegalovirus retinitis following introduction of highly active anti-retroviral therapy: uveitis as a possible indicator of good ocular prognosis. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol236:** 795-977, 1998.

HO D. **Plenary Abstract Th19*.** In: XI International Conference on AIDS, Vancouver, July7-12, 1996.

HO M. - Cytomegalovirus infections and diseases. **Dis. Mth.24:** 4, 1978.

HO M. Human cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients. In: GREENOUGH WB, III & MERIGAN TC, ed. Cytomegalovirus biology and infection: Current topics in infectious diseases. **New York, Plenum Press, cap.11.** p.171-204, 1982.

HOHLER T, KRUGER A, GERKEN G, SCHNEIDER PM, MEYER Z, BUSCHENFELDE KH, RITTNER C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. **J Med Virol,54(3):**173-7, 1998.

HOLBROOK JT, JABS DA, WEINBERG DV, LEWIS RA, DAVIS MD, FRIEDBERG D. Studies of Ocular Complications of AIDS (SOCA) Research Group. Visualloss in patients with cytomegalovirus retinitis and acquired immunodeficiency syndrome before widespread availability of highly active antiretroviral herapy. **Arch Ophthalmol. 121(1):** 99-107, 2003.

HOLLAND GN. Acquired immunodeficiency syndrome and ophthalmology: the first decade. **Am J Ophthalmol. 114(1):** 86-95, 1992.

HORSWITZ CA, HENLE W & HENLE G. Diagnostic aspects of the cytomegalovirus mononucleosis syndrome in previously healthy persons. **Postgrad Med66:** 153-158, 1979.

HUTTO C. - Epidemiology of Cytomegalovirus infection in young children day care vs. home care. **Ped. infect. Dis.4:** 149, 1985.

JABS DA, GREEN WR, FOX R, POLK FB, BARTLETT JG. Ocular manifestations of acquired immune deficiency syndrome. **Ophthalmology. 96(7):** 1092-9, 1989.

JABS DA, BOLTON SG, DUNN JP & PALESTINE AG. Discontinuing anticytomegalovirus therapy in patients with immune reconstitution after combination antiretroviral therapy. **Am J Ophthalmol126:** 817-822, 1998.

JABS DA. AIDS and ophthalmology in 2004. **Arch Ophthalmol. 122(7):** 1040-2, 2004.

JABS DA, MARTIN BK, FORMAN MS, et al. Cytomegalovirus (CMV) blood DNA load, CMV retinitis progression, and occurrence of resistant CMV in patients with CMV retinitis. **J Infect Dis., 192:** 640-9, 2005.

JACOBSON MA, ZEGANS M, PAVAN PR, O'DONNELL JJ, SATTLER F, RAO N, OWENS S & POLLARD R. Cytomegalovirus retinitis after initiation of highly active antiretroviral therapy. **Lancet349:** 1443-1445, 1997.

JACOBSON MA, STANLEY H, HOLTZER C, et al. Natural history and outcome of new AIDS-related cytomegalovirus retinitis in the era of HAART. **Clin Inf Dis30:** 231-3, 2000.

JANG WH, YANG Y, YEA SS, LEE YJ, CHUN JH, KIM H, KIMMS, PALK KH. The -238 tumor necrosis factor-α promoter polymorphism is associated to cancers. **Cancer Letters166(1):** 41-46, 2001.

JONGENEEL CV, BRIANT L, UDALOVA IA, SEVIN A, NEDOSPASOV AS, CAMBON-THOMSEN A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. **Proc Natl Acad Sci U S A, 88(21):**9717-21, 1991.

JUSZCZYNSKI P, KALINHA E, BIENVENU J, WOSZCZEK G, BOROWIEC M,ROBAK et al. Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic

polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. **Blood 100:** 3037-40, 2002.

KANTOR R, SHAFER RW, FOLLANSBEE S, TAYLOR J, SHILANE D, HURLEY L. Evolution of resistance to drugs in HIV-1 infected patients failing antiretroviral therapy. **AIDS18(11):**1503-11, 2004.

KARAVELLAS MP, PLUMMER DJ, MACD-ONALD JC, TORRIANI FJ, SHIFELT CL, AZEN SP & FREEMAN WR. Incidence of immune recovery vitritis in cytomegalovirus retinitis patients following institution of successful highly active antiretroviral therapy. **J Infect Dis 179:**697-700, 1999.

KASEM H, GALLAGHER G, OH HH, STUART R C. Increased TNFa2 microsatellite allele frequency in proximal gastric adenocarcinoma. **Gastroenterology, 114(2):**2542, 1998.

KEMPEN J.H., MIN YI. FREEMAN W.R., et al. Risk of immune recovery uveitis in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis**. Ophthalmology 3:** 684-94, 2006.

KHOO SH, PEPPER L, SNOWDEN N, HAJEER A H, VALLELY P, WILKINS E G, MANDAL BK, OLLIER WE. Tumor necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression. **Aids, 11(4):** 423-8, 1997.

KIRK C W, DROOGAN AG, HAWKINS S.A, MCMILLAN SA, NEVIN NC, GRAHAM CA. Tumor necrosis factor microsatellites show association with multiple sclerosis. **J Neurol Sci, 147 (1):**21-25, 1997.

KROEGER KM, CARVILLE KS, ABRAHAM LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **Mol Immunol. 34:** 391-9, 1997.

KRUGMAN S. & KATZ S.L. - Infectious Diseases of Children. 7th. ed. **St. Louis,** C.V. Mosby**,** 1981.

LEE YH, HARLEY JB AND NATH SK . Meta-analysis of TNF-α promoter – 308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. **European Journal of. Human Genetics,14:** 364-371, 2006.

LOUIS E, FRANCHIMONT D, PIRON A, GEVAERT Y, SCHAAF-LAFONTAINE N, ROLAND S, MAHIEU P, MALAISE M, DE GROOTE D, LOUIS R, BELAICHE J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. **Clin Exp Immunol. Sep;113(3):** 401-6, 1998.

MACMANUS, R., MOLONEY, M., BORTON, M., FINCH, A., CHUAN, Y-T., LAWLOR, E., WEIR, D. G., KELLEHER, D. Association of Celiac Disease with Microsatellite Polymorphisms Close to the Tumor Necrosis Factor Genes. **Hum Immunol, 45:** 24-31, 1996.

MARSH HP, HALDAR NA, BUNCE M, MARSHALL SE, LE MONIER K, WINSEY SL, CHRISTODOULOS K, CRANSTON D, WELSH KI, HARRIS AL. Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation. **Br J Cancer, 89**: 1096-1101, 2003.

MARTINEZ A, FERNANDEZ-ARQUERO M, PASCUAL-SALCEDO D, CONEJERO L, ALVES H, BALSA A, CONCHA, EG. Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum, 43:**1366-70, 2000.

MARTINS MC, BURNIER JR M, MUCCIOLI C & BELFOR JR R. Achados anatomopatológicos nas manifestações oculares da aids. In: MUCCIOLI C & BELFORT JR R. **Manifestações oculares da aids**. Rio de Janeiro, Cultura Médica, p. 22-31, 1999.

MATTEY DL, HAJEER AH, DABABNEH A, et al. Association of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica with different tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms. **Arthritis & Rheumatism, 43(8):** 1749-1755, 2000.

MATTHIAS C, JAHNKE V, FRYER A, STRANGE R, OLLIER W, HAJEER A. Influence of tumour necrosis factor microsatellite polymorphisms on susceptibility to head and neck cancer, **Acta Otolaryngol, 118(2):**284-8, 1998.

McDONALD AE. Treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS with 9-(1,3-dihtdrixt-2-propoxymethyl)guanine. **Can J Ophthalmol22:** 48-52, 1987.

MEYERS JD, SPENCER JR HC, WATTS JC, GREGG MB, STUART JA, TROUPIN RH & THOMAS ED. Cytomegalovirus pneumoniae after human marrow-transplantation. **Ann Intern Med82:** 181-188, 1975.

MILLER AS, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. **Nucleic Acids Res,16:** 1215, 1988.

MITCHELL SM, MEMBREY WL, YOULE MS, OBI A, WORREL S & GAZZARD BG. Cytomegalovirus retinitis after the initiation of highly active antiretroviral therapy: a 2 year prospective study. **Br J Ophthalmol83:** 652-655, 1999.

MIURA CS, MIURA E, MOMBACH AB, CHESKY M. The prevalence of congenital cytomegalovirus infection in newborn infants at an intensive care unit in a public hospital. **JOURNAL DE PEDIATRIA,82;** 46-50, 2006.

MOCARSKY JR ES. Cytomegaloviruses and their replication. In: FIELDS BN & KNIPE PM, eds. Fields virology, 3th ed, **New York, Raven Press**, p.2447-2492, 1996.

MULCAHY B, WALDRON-LYNCHF, MCDERMOTT MF, et al. Genetic variability in the tumornecrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis. **Am J HumGenet, 59:** 676, 1996.

MUCCIOLi C, BELFORT JÚNIOR R, LOTTENBERG C, LIMA J, SANTOS P, KIM M, et al. Achados oftalmológicos em AIDS: avaliação de 445 casos atendidos em um ano. **Rev Assoc Med Bras (1992).40(3):**155-8,1994.

MUCCIOLI C & BELFORT JR R. Retinite por citomegalovírus. In:. **Manifestações oculares da aids**. Rio de Janeiro, Cultura Médica, p. 56-79, 1999.

NEDOSPASOV SA, UDALOVA IA, KUPRASH DV, TURETSKAYA RL. DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/lymphotoxin alleles tagged by two closely linked microsatellites in the upstream region of the lymphotoxin (TNF-beta) gene. **J Immunol, 147(3):**1053-9, 1991.

NG P, McCLUSKEY P, McCAUGHAN G, GLANVILLE A, McDONALD P & KEOGH A. – Ocular complications of heart, lung and liver transplantation. **Br J Ophthalmol 82:** 423-428, 1988.

NORDLANDER, A., UZUNEL, M., MATTSON, J., REMBERGER, M. The TNFd4 allele is correlated to moderate-to-severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. **British J Haemol,119,** 1133-1136, 2002.

ORAL GANCICLOVIR EUROPEAN AND AUSTRALIAN COOPERATIVE STUDY GROUP. INTRAVENOUS VERSUS ORAL GANCICLOVIR. Comparative study of efficacy in the prevention of cytomegalovirus retinitis recurrence in patients with AIDS. **AIDS9:** 471-478, 1995.

PALELLA FJ Jr, DELANEY KM, MOORMAN AC, LOVELESS MO, FUHRER J, SATTEN GA. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human

immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N **Engl J Med. 338(13):** 853-60, 1998.

PANNUTI, C.S. - Infecção por Cytomegalovirus. **Pediat. (S.Paulo) 6:** 144, 1984.

PANTELIDIS P, MCGRATH DS, SOUTHCOTT AM, BLACK CM, BOIS RM. Tumor necrosis factor-α production in fibrosing alveolitis is macrophage subset specific. **Respir Res,2:** 365-372, 2001.

PASS RF, ESTAGNO S, MYERS GJ & ALFORD CA. Outcome of symptomatic congenital CMV infection: results of long-term longitudinal follow-up. **Pediatrics 66:** 758-762, 1980.

PELLETIER R, PRAVICA V, PERREY C, XIA D, FERGUSON RM, HUTCHINSON I, OROSZ C. Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. **Transplantation. Aug 27; 70(4):** 674-80, 2000.

POCIOT F, BRIANT L, JONGENEEL CV, MOLVIG J, WORSAAE H, ABBAL M, THOMSEN M, NERUP J, CAMBON-THOMSEN A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Immunol,23(1):** 224-31, 1993.

POSTELMANS L, GERARD M, SOMMEREIHNS B, CASPERS L, CLUMECK N & LIBERT J. Impact of anti-retroviral treatment with protease inhibitors on the evolution of cytomegalovirus retinitis in the patient carrying acquired immunodeficiency syndrome. **Bull Soc Belge Ophtahlmol 267:** 133-144, 1997.

PRICE P, KEANE NM, STONE SF, et al. MHC haplotypes affect the expression of opportunistic infections in HIV patients. **Hum Immunol,62:** 157-64, 2001.

REED JB, SCHWAB IR, GORDON J & MORSE LS. Regression of cytomegalovirus retinitis associated with protease-inhibitor treatment in patients with aids. **Am J Ophthalmol.124:** 199-205, 1997.

REYNARD, M. P.; TURNER, D.; NAVARRETE, C. V.; Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-α, interleukin-10, interferon-α and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. **European Journal of Immunogenetics,27:** 241–249, 2000.

REYNOLDS DW, ESTAGNO S, STUBBS G, DAHLE AJ, LIVINGSTON MM, SAXON SS & ALFORD JR CA. Inapparent congenital cytomegalovirus infection with elevated cord IgM levels. **N Engl J Med 290:** 291-296, 1974.

REVIRON D, DUSSOL B, ANDRE M, BRUNET P, MERCIER P, BERLAND Y. TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients.**Transplant Proc. Feb-Mar;33(1-2):** 350-1, 2001.

RODRIGUES MLV. Prevenção da cegueira. In: RODRIGUES MLV, ed. **Oftalmologia clínica.** Rio de Janeiro, Cultura Médica, p.502-522, 1992.

RODRIGUES MLV, SOUZA NV & FIGUEIREDO JFC. AIDS: **Ocular manifestations in Brazil.** Ribeirão Preto, FMRP-USP, 15 p, 1996.

RODRIGUES MLV, FIGUEIREDO JFC, DEGHAIDE NHS, et al. Frequency of HLA class 1 and 2 alleles in Brazilian patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis. **Acta Ophthalmol Scand,81:** 514-6, 2003.

RODRIGUES MLV, DEMARCO ALG, FIGUEIREDO JF, SOUZA NV, DEGHAIDE NHS, ROMÃO E, DONADI EA. HLA-B35 antigen is associated to susceptibility to ocular infections in patients with AIDS. **Ophthalmiic Research 36(S1):** 86, 2004.

RODRIGUES ML, RODRIGUES,MLV, FIGUEIREDO JFC, FREITAS JAAH. Ocular problems in brazilian patients with aids before and in highly antiretroviral therapy (HAART) era. **Braz. J Infect Dis. 11(2):** 2007.

ROOD MJ, van KRUGTEN MV, ZANELLI E, van der LINDEN MW, KEIJSERS V, SCHREUDER GMT, VERDUYN W, WESTENDORP RGPJ, de VRIES R.R.P, BREEDVELD FC, VERWEIJ CL and HUINZINGA WJ. TNF-308A and HLA-DR3 Alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erytematosus. **Arthiritis & Rheumatism43**: 129-134, 2000.

RUBIN RH, COSIMI AB, EOLKOFF-RUBIN NE, RUSSEL PS & HIRSCH MS. Infectious disease syndromes attributable to cytomegalovirus and their significance among renal transplant recipients. **Transplantation 24:** 458-464, 1977.

SALZBERGER B, HARTMANN P, HANSES F, et al. Incidence and prognosis of CMV disease in HIV-infected patients before and after introduction of combination antiretroviral therapy. **Infection 33:** 345-9, 2005.

SCHRIER RD, FREEMAN WR, WILEY CA, McCUTCHAN JA & THE HNRC GROUP. Immune predispositions for cytomegalovirus retinitis in AIDS. **J Clin Invest 95:** 1741-1746, 1995.

SIEGEL S. **Estatística não paramétrica .** São Paulo, McGraw Hill, p.107-124, 1959.SIMOES RT, BETTINI JS, SOARES EG, DUARTE G, GONCALVES MA, SIMOES AL. Tumour necrosis factor microsatellite association with human papillomavirus cervical infection. **Mol Pathol. Oct;56(5):** 305-6, 2003.

SIMOES RT, GONCALVES MA, DONADI EA, SIMOES AL, BETTINI JS, DUARTE G, QUINTANA SM, CARVALHO MW, SOARES EG. Association of tumor necrosis factor a-2 and a-8 microsatellite alleles with human papillomavirus and squamous intraepithelial lesions among women in Brazil. **J Clin Microbiol. Aug;43(8):** 3932-7, 2005.

SKOOG T, ERIKSSON P, HOFFSTEDT J, RYDEN M, HAMSTEN A, ARMER P. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) polymorphisms-857C/A and -863C/A are associated with TNF-alpha secretion from human adipose tissue. **Diabetologia. May;44(5):** 654-5, 2001.

SOOKOIAN SC, GONZALEZ C, PIROLA CJ. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. **Obes Res. Dec; 13(12):** 2122-31, 2005.

SPAIDE RF, GAISSINGER A & PODHORZER JR. Risk factors for cotton-wool spots and for cytomegalovirus retinitis in patients with human immunodeficiency virus infection. **Ophthalmology 102:** 1960-1964, 1995.

SPECTOR SA, MCKINLEY GF, LALEZARI JP, SAMO T, ANDRUCZK R, FOLLANSBEE S, SPARTI PD, HAVLIR DV, SIMPSON G, BUHLES W, WONG R, STEMPIEN M. Oral ganciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in person with AIDS. **N Eng J Med 334:** 1491-1497, 1996.

STAGNO S, REYNOLDS DW, PASS RF & ALFORD Jr CA. - Breast milk and the risk of Cytomegalovirus infection. **N. Engl. J. Med. 302:** 1.073,1980.

STAGNO, S. - Congenital Cytomegalovirus infection. The relative importance of primary and recurrent maternal infection. **N. Engl. J. Med. 306**: 945,1982.

STAGNO S, PASS RF, DWORSKY ME & ALFORD CA. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmition. In: KNOX GE, ed, **Clinical obstetric and gynecology 25:** 563-576, 1982.

STERN H & ELEK SD. - The incidence of infection with Cytomegalovirus in a normal population. **J.Hyg. 63:** 79,1965.

STURFELT, G., HELLMER, G., TRUEDSON, L. TNF microsatellites in systemic lupus erythematosus – a high frequency of the TNFabc 2-3-1 haplotype in multicase SLE families. ***Lupus,*** **Dec, 5(6):** 618-22, 1996.

SVEJGAARD A: HLA and Disease. In: ROSE MR, FRIEDMAN, J & FABRIN JC, ed, **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. 3ed. Washington, Noel Rose and Herman Friedman, p. 912-920, 1986.

TAKEUCHI F, NABETA H, FUSSEL M, CONRAD K, FRANK KH .Association of the TNFa13 microsatellite with systemic sclerosis in Japanese patients. **Ann Rheum Dis. Apr; 59(4):** 293-6, 2000.

TAMBUR AR, YANIV I, STEIN J, LAPIDOT M, SHABTAI E, KFIR B, KLEIN T. Cytokine gene polymorphism in patients with graft-versus-host disease. **Transplant Proc. Feb-Mar;33(1-2):** 502-3, 2001.

TARASSI K, CARTHY D, PAPASTERIADES C, BOKI K, NIKOLOPOULOU N, CARCASSI C, OLLIER WE, HAJEER, AH: HLA-TNF haplotype heterogeneity in Greek SLE patients. **Clin Exp Rheumatol, 16:** 66, 1998.

THAY-KEARNEY ML & JABS DA. Ophthalmic complications of HIV infection. **Med Clin North Am 80:** 1471-1492, 1996.TSUKAMOTO K., OHTA N, SHIRAI Y., EMI M. A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA alpha) locus. **J Hum Gene, 43:** 278, 1998.

TUGLULAR S, BERTHOUX P, BERTHOUX F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor alpha gene at position -308 and TNFd microsatellite in primary IgA nephropathy. **Nephrol Dial Transplant, 18:** 724-731, 2003.

TURNER DM, GRANT SC, LAMB WR, BRENCHLEY PE, DYER PA, SINNOTT PJ, HUTCHINSON IV. A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. **Transplantation**, **Nov 27;60(10):**1113-7, 1995.

UDALOVA IA, NEDOSPOASOV SA. WEBB GC, CHAPLIN DD, URESTSKAYA RL. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. **Genomics, 16:** 180-186, 1993.

VAN DE PIERRE P, BAKKERS E, BATUNGWANAYO J, KESTELYN PL, LEPAGE P, NZARAMBA D, BOGAERTS J, SERUFILIRA A, ROUVROY D, UWIMANA A & BUTZLER JP. Herpes zoster in African patients: an early manifestation of HIV infection. **Scand J Infect Dis 20:** 277-282, 1988.

VAN DER HORST C & WOHL DA. Cytomegalovirus (CMV) retinitis – Prophylaxis and Treatment. Medscape HIV/AIDS, **Clinical Management** Series, 1999.

WASTOWSKI IJ, PERES NT, SIMOES RT, CASTELLI EC, SIMOES AL, MARTINEZ-ROSSI NM, DONADI EA. Identification of a novel 120 bp allele at the TNFd microsatellite locus. **Tissue Antigens Apr; 67 (4):** 318-20, 2006.

WARLE MC, FARHAN A, METSELAAR HJ, HOP WC, PERREY C, ZONDERVAN PE, KAP M, KWEKKEBOOM J, IJZERMANS JN, TILANUS HW, PRAVICA V, HUTCHINSON IV, BOUMA GJ. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? **Liver Transpl. Feb;9(2):** 170-81, 2003.

WELLER TH. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. **N Engl J Med 285:** 203-214, 1971.

WHITLEY RJ & HOLLAND GN . Cytomegalovirus retinitis – evolving therapies in a new era. **N Engl J Med 340:** 1063-1070, 1999.

ANEXOS

ANEXO 1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
www.hcrp.fmrp.usp.br
USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 09 de outubro de 2007

Ofício nº 3504/2007
CEP/MGV

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **"POLIMORFISMO DOS MICROSSATÉLITES DA REGIÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL EM PACIENTES COM AIDS E RETINITE POR CITOMEGALOVÍRUS E AIDS SEM CITOMEGALOVÍRUS",** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 256ª Reunião Ordinária realizada em 08/10/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 4018/2007.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
NEIFI HASSAN SALOUM DEGHAIDE
PROF. DR. EDUARDO ANTONIO DONADI (Orientador)
Depto. de Clínica Médica

ANEXO 2

excelência desde 1956

50 anos
USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Av. Bandeirantes, 3900 – 14049-900 Ribeirão Preto – SP
Fone: +55.16.3602-2566 / Fax: +55.16.3633-6695

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: PACIENTES e CONTROLES

Nome da Pesquisa: "Polimorfismo dos microssatélites da região do fator de necrose tumoral em pacientes com aids e retinite por citomegalovírus e aids sem citomegalovírus**"**

Pesquisadora Responsável: Neifi Hassan Saloum Deghaide

Em 1999, foi realizado o estudo "**Quantificação da viremia e análise de subtipos HLA em pacientes com AIDS e seu papel na predisposição do desenvolvimento da retinite pelo citomegalovírus"**, quando obtivemos sua autorização para a realização desde estudo, aprovado pelo Comitê de Ética processo n°1525/1998.

Em 2002, foi realizado o estudo **"Tipificação de antígenos leucocitários de histocompatibilidade em pacientes com manifestações oculares da AIDS**, aprovado pelo Comitê de Ética processo n° 8992/2001 mediante seu consentimento, foi coletado amostra de sangue.

Assim sendo, estamos propondo um novo trabalho que constitui em uma continuação das pesquisas anteriores para verificação de outros fatores envolvidos no desenvolvimento da doença em análise.

O Sr(a) está sendo convidado a participar deste estudo. Caso concorde em participar não será necessário colher amostra de sangue adicional. O material a ser estudado será obtido a partir de sobra do material que o Sr(a) colheu nos estudos anteriores acima citados, para melhor conhecimento da sua doença. Não haverá necessidade de consulta de prontuários. As pesquisas futuras poderão não trazer benefício imediato ao Sr(a). Os resultados destes exames serão publicados em revistas de trabalhos científicos, mas não será identificado o seu nome. Todos os resultados são analisados em grupos sem citação do nome do paciente de forma a garantir sigilo absoluto de sua identidade.

O (A) Sr.(a) tem a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que seja prejudicada a sua consulta médica ou o seu atendimento neste hospital. Durante e após o término dos trabalhos de pesquisa, o(a) Sr.(a) será devidamente acompanhado(a) pelos médicos que estão cuidando do Sr (a) e terá a garantia de receber o esclarecimento de qualquer dúvida e informações sobre o estudo.

Não haverá nenhum gasto em dinheiro para o(a) Sr.(a) ao participar deste estudo. Por outro lado, não haverá nenhum ganho de dinheiro para a sua participação neste estudo.

Agradeço sua colaboração, assinando juntamente com o(a) Sr.(a) o presente termo, sendo que uma cópia ficará em suas mãos.
Estou ciente e de acordo,

Assinatura do paciente_____

Neifi Hassan Saloum Deghaide_____

ANEXO 3

Ribeirão Preto, 09 de outubro de 2007

Ofício nº 3520/2007
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 7581/2007

Prezado Professor,

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 256ª Reunião Ordinária realizada em 08.10.2007, recebeu a "Proposta de criação do banco de amostras do núcleo de pesquisa em imunogenética (BANPI)" e a enquadrou na categoria: **APROVADO**, **bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. EDUARDO ANTONIO DONADI
Depto. de Clínica Médica – Laboratório de Imunologia Molecular

ANEXO 4

Grupo I – Tipificação dos microssatélites e dos SNPs -238 e -308 do TNF em Pacientes com aids e R-CMV

	TNFa	TNFb	TNFc	TNFd	TNFe	-238	-308
1	0104	0505	0102	0203	0303	GG	GG
2	0210	0104	0102	0404	0103	GG	GG
3	0206	0105	0102	0405	0103	GG	GG
4	0110	0305	0202	0406	0303	GA	GG
5	0609	0405	0102	0203	0303	GG	GG
6	0206	0505	0202	0304	0203	GA	GG
7	0108	0405	0102	0203	0303	GA	GG
8	0204	0505	0102	0405	0303	GA	GG
9	0206	0305	0102	0103	0203	GG	GA
10	0507	0405	0102	0304	0203	GG	GG
11	0210	0104	0202	0304	0103	GG	GG
12	1011	0404	0101	0303	0303	GG	GG
13	0710	0405	0102	0304	0303	GA	GG
14	0407	0505	0101	0303 f	0303	GG	GA
15	0610	0405	0101	0304	0303	GG	GG
16	0204	0105	0102	0304	0103	GG	GA
17	0709	0404	0101	0303	0303	GG	GG
18	1010	0404	0101	0303	0303	GG	GG
19	0102	0105	0202	0404	0103	GA	GG
20	0410	0405	0101	0003	0303	GG	GG
21	0610	0104	0102	0304	0303	GG	GG
22	0109	0405	0202	0203	0303	GA	GG
23	0606	0507	0101	0303	0303	GG	GG
24	0811	0304	0101	0303	0303	GG	GG
25	0207	0104	0102	0304	0103	GG	GG
26	0211	0104	0102	0304	0103	GG	GG
27	0204	0105	0102	0404	0103	GG	GG
28	0206	0105	0102	0405	0103	GG	GG
29	1213	0404	0101	0405	0303	GG	GG
30	0113	0405	0102	0203	0303	GA	GG
31	0206	0305	0102	0103	0203	GG	GG
32	0206	0105	0102	0304	0103	GG	GG
33	0607	0505	0102	0304	0303	GA	GG
34	0206	0505	0102	0404	0303	GA	GG
35	0506	0507	0101	0303	0303	GG	GG
36	0708	0105	0102	0304	0303	GG	GG
37	0606	0105	0102	0305	0303	GG	GG
38	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
39	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
40	0202	0101	0202	0404	0101	GG	GG

41	0406	0505	0101	0304	0303	GG	GG
42	0610	0405	0101	0303	0303	GG	GG
43	0506	0507	0101	0405	0303	GG	GA
44	0206	0305	0102	0104	0303	GG	AA
45	0210	0104	0102	0304	0103	GA	GG
46	0211	0104	0102	0304	0103	GA	GA
47	0511	0405	0102	0303	0203	GA	GG
48	0607	0405	0101	0304	0303	GA	GG
49	0506	0505	0102	0303	0203	GA	GG
50	0203	0103	0102	0104	0103	GA	GA
51	0206	0105	0202	0405	0303	GA	GA
52	0508	0105	0202	0405	0303	GA	GG

ANEXO 5

Grupo II – Tipificação dos microssatélites e dos SNPs -238 e -308 do TNF em Pacientes com aids sem R-CMV

	TNFa	TNFb	TNFc	TNFd	TNFe	-238	-308
1	0207	0304	0101	0103	0303	GG	GG
2	0207	0105	0202	0404	0303	GA	GG
3	1010	0404	0101	0304	0303	GG	GG
4	0606	0505	0101	0304	0303	GG	GG
5	0406	0505	0101	0305	0303	GG	GG
6	0406	0505	0101	0303	0303	GG	GA
7	1010	0404	0101	0304	0303	GG	GG
8	0210	0304	0101	0103	0303	GG	GA
9	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
10	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
11	0207	0103	0102	0104	0303	GG	GA
12	0610	0407	0101	0303	0303	GG	GG
13	0610	0405	0101	0303	0303	GA	GG
14	0207	0104	0102	0304	0103	GG	GG
15	0507	0107	0102	0304	0303	GA	GG
16	0404	0505	0101	0204	0303	GG	GG
17	0206	0103	0102	0104 f	0303	GG	GA
18	0107	0505	0102	0304	0303	GG	GG
19	0202	0103	0102	0104	0103	GG	GA
20	1113	0404	0101	0305	0303	GG	GG
21	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
22	0713	0404	0101	0303	0303	GG	GG
23	0207	0101	NA	NA	0303	GG	GG
24	0407	0405	0101	0303	0303	GG	GA
25	0707	0505	0101	0303	0303	GG	GG
26	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
27	0710	0304	0101	0303	0303	GG	GG
28	0202	0103	0102	0104	0103	GG	GA
29	0511	0405	0102	0304	0203	GG	GG
30	0206	0305	0101	0103	0303	GG	GA
31	0410	0405	0101	0003 f	0303	GG	GG
32	0510	0405	0102	0405	0303	GG	GG
33	1113	0304	0101	0305	0303	GG	GG
34	0707	0101	0202	0204	0303	GG	GG
35	0204	0105	0102	0304	0103	GG	GG
36	0202	0103	0102	0104	0103	GG	GG
37	0210	0405	0102	0404	0303	GA	GG
38	0410	0405	0101	0303	0303	GG	GG
39	0107	0405	0102	0205 f	0303	GA	GG
40	0411	0405	0101	0103f	0303	GG	GG

41	0409	0405	0102	0203	0303	GG	GA
42	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
43	0210	0404	0102	0104	0303	GG	GA
44	0507	0405	0102	0306	0303	GG	GG
45	0610	0405	0101	0303	0303	GG	GG
46	0810	0505	0101	0303	0303	GG	GG
47	0204	0305	0101	0001	0303	GG	GA
48	0205	0107	0102	0304	0103	GG	GG
49	1011	0404	0101	0303	0303	GG	AA
50	0406	0505	0101	0003	0303	GG	GG
51	0607	0405	0102	0303	0203	GG	GG
52	0506	0505	0102	0305	0203	GG	GG
53	0606	0505	0101	0303	0303	GG	GG
54	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
55	0607	0105	0202	0304	0203	GG	GG
56	0210	0304	0101	0103	0303	GG	GG
57	0407	0105	0102	0303	0303	GG	GG
58	0106	0507	0102	0203	0303	GA	GG
59	0510	0405	0102	0304	0203	GG	GG
60	0205	0305	0102	0105	0303	GG	GG
61	0405	0507	0101	0304	0303	GG	AA
62	0610	0405	0101	0303	0303	GG	GG
63	0609	0305	0102	0405	0303	GG	GG
64	0508	0405	0102	0305	0303	GG	GG
65	0607	0405	0101	0303	0303	GG	GG
66	0404	0505	0101	0304	0303	GG	GA
67	0510	0407	0101	0304	0303	GG	GA
68	1010	0404	0101	0404	0303	GG	GG
69	0207	0104	0102	0304	0103	GG	GG
70	0102	0105	0202	0204	0103	GA	GG
71	0610	0104	0102	0306	0303	GG	GG
72	0909	0404	0101	0303	0303	GG	GG
73	0211	0104	0102	0304	0103	GG	GG
74	0202	0101	0202	0404	0101	GG	GG
75	0410	0405	0101	0304 f	0303	GG	GG
76	0206	0305	0101	0305	0303	GG	GA
77	0105	0507	0102	0204	0103	GG	GA
78	0709	0404	0102	0204	0303	GG	GG
79	0102	0105	0202	0404	0103	GG	GG
80	0410	0407	0102	0405	0303	GG	GG
81	0205	0307	0101	0105	0303	GG	AA
82	0510	0407	0101	0305	0303	GG	GA
83	0710	0404	0101	0303	0303	GG	GG
84	0102	0305	0102	0104	0303	GA	GA
85	0207	0405	0102	0304	0303	GA	GG
86	0710	0104	0102	0304	0303	GG	GG
87	0607	0104	0102	0304	0303	GG	GG
88	0607	0104	0102	0304	0303	GG	GG

89	0207	0103	0102	0104	0303	GA	GA
90	0711	0104	0102	0304	0303	GG	GG
91	0607	0105	0102	0304	0303	GG	GG
92	0710	0404	0101	0303	0303	GG	GG
93	0713	0404	0101	0305	0303	GA	GG
94	0511	0405	0102	0304	0303	GA	GG
95	0505	0505	0202	0405	0203	GA	GG
96	0611	0405	0101	0303	0303	GA	GG
97	1012	0404	0101	0304	0303	GA	GA
98	0409	0405	0102	0205	0303	GG	GG
99	0606	0505	0101	0305	0303	GA	GG
100	0606	0105	0102	0506	0303	GG	GG
101	0205	0307	0101	0104	0303	GG	AA
102	0206	0305	0101	0103	0303	GG	GA
103	0506	0505	0102	0305	0303	GG	GG
104	0206	0305	0101	0105	0303	GA	GA
105	0811	0404	0101	0303	0303	GA	GG
106	0206	0105	0102	0304	0103	GG	GG
107	0607	0507	0101	0303	0303	GA	GA
108	0211	0304	0101	0101	0303	GA	GA
109	0205	0107	0102	0304	0103	GG	GG
110	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
111	0607	0405	0101	0303	0303	GA	GG
112	0204	0105	0102	0304	0103	GG	GA
113	0205	0105	0202	0404	0102	GG	GG
114	0211	0104	0102	0304	0103	GG	GG
115	0610	0405	0101	0304	0303	GG	GG
116	0107	0505	0102	0203	0303	GA	GG
117	0110	0405	0102	0203	0303	GA	GG
118	0206	0305	0101	0103	0303	GG	GA
119	0206	0105	0102	0405	0103	GG	GG
120	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
121	0211	0304	0101	0103	0303	GG	GA
122	0507	0505	0102	0506	0303	GG	GG
123	0407	0405	0101	0303	0303	GG	GA
124	0710	0304	0102	0304	0303	GG	GG
125	0613	0405	0101	0305	0303	GG	GG
126	0406	0505	0102	0304	0203	GG	GA
127	0609	0405	0202	0204	0203	GG	GG
128	0102	0305	0102	0404	0303	GA	GA
129	0505	0507	0102	0404	0303	GG	GA
130	0213	0104	0102	0405	0103	GA	GA
131	0513	0407	0101	0506	0303	GG	GA
132	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
133	0606	0505	0101	0305	0303	GG	GG
134	0210	0304	0101	0103	0303	GG	GG
135	0108	0405	0102	0203	0303	GG	GG
136	0607	0505	0101	0303	0303	GG	GG

137	0413	0405	0101	0305	0303	GG	GA
138	0411	0405	0101	0003	0303	GG	GG
139	0710	0405	0101	0303	0303	GG	GG
140	1011	0304	0102	0203	0303	GG	GG
141	0408	0505	0102	0004	0303	GA	GG
142	0211	0405	0102	0304	0303	GA	GG
143	0610	0305	0102	0306	0303	GG	GG
144	0510	0405	0102	0305	0303	GG	GG
145	0102	0305	0102	0407	0303	GA	GG
146	0508	0405	0102	0304	0203	GG	GG
147	0206	0204	0101	0103	0303	GG	GA
148	0709	0104	0102	0405	0303	GG	GG
149	0207	0505	0102	0104	0303	GA	GG
150	0611	0505	0102	0303	0203	GG	GG
151	0610	0305	0102	0406	0303	GG	GG
152	0204	0205	0102	0306	0103	GG	GA
153	0611	0505	0102	0303	0103	GG	GG
154	0910	0505	0202	0303	0103	GG	GG
155	0610	0505	0101	0304	0303	GG	GG
156	0210	0304	0101	0103	0303	GG	GA
157	0912	0303	0102	0204	0303	GG	GG
158	0713	0303	0101	0305	0103	GG	GG
159	1111	0404	0101	0305	0303	GG	GG
160	0606	0505	0102	0305	0303	GG	GG
161	0405	0507	0102	0307	0203	GG	GA
162	0306	0507	0102	0304	0303	GA	GG
163	0710	0404	0101	0303	0103	GG	GG
164	0505	0507	0102	0405	0303	GG	GA
165	0204	0105	0102	0404	0103	GG	GG
166	0506	0505	0102	0303	0303	GG	GG
167	0106	0505	0102	0206	0103	GA	GG
168	0105	0105	0102	0405	0103	GG	GG
169	0303	0505	0202	0303	0303	GG	AA
170	0511	0407	0202	0304	0103	GG	GA

ANEXO 6

Grupo III – Tipificação dos microssatélites e dos SNPs -238 e -308 do TNF em indivíduos controles.

	TNFa	TNFb	TNFc	TNFd	TNFe	-238	-308
1001	0105	0505	0102	0505	0303	GA	GG
1002	1013	0404	0101	0305	0303	GG	GG
1003	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1004	0408	0405	001	0303	0303	GG	GG
1005	0202	0103	0102	0104	0103	GG	GG
1006	0211	0304	0101	0103	0303	GG	GA
1007	0210	0304	0101	0104	0303	GG	GA
1008	0211	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1009	0213	0104	0102	0405	0103	GG	GG
1010	0405	0507	0101	0304	0303	GG	AA
1011	0710	0104	0102	0204	0303	GG	GG
1012	0210	0305	0202	0404	0303	GA	GG
1013	0711	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1014	0211	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1015	0209	0304	0102	0102	0303	GG	GA
1016	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1017	0506	0105	0202	0506	0303	GG	GG
1018	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1019	0202	0305	0102	0104	0303	GA	GG
1020	0211	0304	0101	0103	0303	GG	GG
1021	0210	0304	0101	0103	0303	GG	GA
1022	0607	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1023	0207	0304	0101	0103	0303	GG	GG
1024	0208	0101	0202	0204	0103	GG	GG
1025	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1026	0713	0404	0101	0306	0303	GG	GG
1027	0610	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1028	0207	0304	0101	0101	0303	GG	GG
1029	0307	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1030	0206	0105	0202	0404	0101	GG	GG
1031	0607	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1032	0511	0405	0102	0304	0203	GG	GG
1033	0209	0104	0101	0204	0103	GG	GG
1034	1011	0404	0101	0304	0303	GG	GG
1035	0406	0505	0101	0303	0303	GG	GG
1036	0206	0505	0102	0405	0303	GA	GG
1037	0610	0405	0101	0305	0303	GG	GG
1038	0204	0105	0102	0004	0103	GG	GG
1039	0111	0405	0102	0203	0303	GA	GG
1040	0606	0105	0102	0304	0303	GG	GG
1041	0506	0507	0101	0303	0303	GG	GG
1042	0410	0405	0102	0305	0303	GG	GG
1043	0410	0405	0101	0303	0303	GG	GA

1044	0610	0405	0101	0404	0303	GG	GG
1045	0207	0101	0202	0404	0103	GG	GG
1046	1011	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1047	0205	0107	0102	0404	0103	GG	GA
1048	0713	0404	0101	0305	0303	GG	AA
1049	0606	0505	0101	0303	0303	GG	GG
1050	0207	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1051	0507	0407	0101	0303	0303	GG	GG
1052	0204	0105	0102	0304	0103	GG	GG
1053	0609	0405	0102	0203	0303	GG	GG
1054	0106	0505	0102	0203	0303	GA	GG
1055	0506	0505	0102	0303	0203	GG	GG
1056	0710	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1057	0511	0407	0101	0304	0103	GG	GG
1058	0211	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1059	0211	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1060	0107	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1061	0507	0505	0202	0405	0303	GA	GG
1062	0710	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1063	0610	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1064	0207	0105	0202	0404	0303	GA	GG
1065	1011	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1066	0510	0405	0102	0304	0203	GG	GG
1067	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1068	0410	0407	0102	0405	0303	GG	GG
1069	0410	0407	0102	0405	0303	GG	GA
1070	0710	0404	0101	0404	0303	GG	GG
1071	0710	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1072	0506	0505	0102	0304	0203	GG	GG
1073	1313	0404	0101	0506	0303	GG	GG
1074	0611	0405	0101	0305	0303	GG	GG
1075	0406	0505	0102	0505	0303	GG	GG
1076	0610	0104	0102	0304	0303	GG	GG
1077	0202	0101	0202	0404	0101	GA	GG
1078	0111	0405	0102	0203	0303	GA	GG
1079	0811	0404	0101	0103	0303	GG	GG
1080	0711	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1081	0709	0404	0102	0203	0303	GG	GG
1082	0411	0405	0101	0305	0303	GG	GG
1083	0607	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1084	0613	0405	0101	0305	0303	GG	GG
1085	0410	0405	0101	0303	0303	GG	GA
1086	0206	0305	0101	0103	0303	GG	GG
1087	0211	0304	0101	0103	0303	GG	GG
1088	0210	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1089	0614	0405	0101	0305	0303	GG	GG
1090	0111	0405	0102	0303	0303	GA	GG
1091	0406	0105	0102	0005	0303	GG	GG

1092	0609	0405	0102	0204	0303	GG	GG
1093	0710	0304	0102	0304	0303	GG	GG
1094	0410	0405	0101	0304	0303	GG	GA
1095	0207	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1096	0413	0405	0101	0003	0303	GG	GG
1097	0610	0304	0101	0306	0303	GG	GG
1098	0413	0405	0102	0305	0303	GG	GG
1099	0211	0304	0101	0103	0303	GG	GG
1100	0407	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1101	0610	0405	0101	0304	0303	GG	GG
1102	0202	0103	0102	0104	0103	GG	GG
1103	1011	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1104	0710	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1105	0611	0405	0101	0306	0303	GG	GG
1106	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1107	0610	0405	0101	0405	0303	GG	GG
1108	0106	0505	0102	0405	0303	GA	GG
1109	0205	0305	0102	0104	0203	GG	GG
1110	0207	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1111	0202	0101	0202	0404	0101	GG	GG
1112	0410	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1113	0506	0507	0101	0304	0303	GG	GA
1114	0607	0105	0102	0203	0303	GG	GG
1115	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1116	0211	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1117	0210	0304	0101	0103	0303	GG	GG
1118	0111	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1119	0710	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1120	0610	0405	0101	0304	0303	GG	GG
1121	0202	0405	0202	0404	0103	GG	GG
1122	0209	0103	0202	0405	0103	GG	GG
1123	0410	0405	0101	0003	0303	GG	GG
1124	0209	0104	0202	0204	0103	GG	GG
1125	0206	0303	0102	0405	0103	GG	GG
1126	0208	0105	0202	0404	0103	GG	GG
1127	0607	0505	0102	0304	0303	GA	GG
1128	0202	0101	0202	0404	0101	GG	GG
1129	0411	0405	0101	0305	0303	GG	GG
1130	0213	0104	0102	0406	0103	GG	GG
1131	1010	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1132	0107	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1133	0405	0505	0102	0305	0303	GG	GA
1134	0206	0103	0102	0104	0303	GA	GA
1135	0710	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1136	0204	0505	0102	0304	0303	GA	GA
1137	0406	0505	0101	0304	0303	GG	GG
1138	0607	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1139	0607	0505	0101	0203	0303	GG	GG

1140	0213	0104	0102	0405	0103	GA	GG
1141	0211	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1142	0202	0103	0102	0104	0103	GG	GA
1143	0408	0105	0102	0002	0303	GG	GG
1144	0206	0105	0102	0304	0103	GG	GG
1145	0510	0407	0101	0303	0303	GA	GG
1146	0606	0505	0101	0305	0303	GG	GG
1147	0211	0104	0102	0404	0103	GG	GG
1148	0404	0005	0101	0304	0303	GG	GG
1149	0606	0505	0101	0306	0303	GG	GG
1150	0206	0505	0102	0304	0303	GA	GG
1151	1010	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1152	0610	0305	0102	0304	0303	GG	GG
1153	1011	0404	0101	0304	0303	GG	GG
1154	0611	0405	0102	0303	0203	GG	GG
1155	0209	0304	0102	0203	0303	GG	GA
1156	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1157	0206	0305	0101	0103	0303	GG	GA
1158	0406	0505	0101	0305	0303	GG	GG
1159	0205	0305	0102	0103	0203	GG	GA
1160	0510	0405	0102	0306	0303	GG	GG
1161	1013	0404	0101	0305	0303	GG	GG
1162	0207	0505	0102	0304	0303	GA	GG
1163	0101	0105	0202	0204	0103	GA	GG
1164	0610	0305	0102	0103	0303	GG	GG
1165	0407	0405	0101	0303	0303	GG	GA
1166	0911	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1167	0711	0104	0102	0203	0303	GG	GG
1168	0306	0105	0202	0404	0102	GG	GG
1169	0204	0105	0102	0005	0103	GG	GG
1170	0206	0105	0102	0304	0103	GG	GG
1171	0212	0304	0101	0103	0303	GG	GA
1172	0205	0505	0202	0404	0203	GA	GG
1173	0607	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1174	1012	0304	0102	0304	0303	GG	GG
1175	0102	0305	0102	0104	0303	GA	GA
1176	0210	0304	0101	0103	0303	GG	GA
1177	0611	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1178	0207	0304	0101	0103	0303	GG	GA
1179	0210	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1180	0606	0505	0101	0305	0303	GG	GG
1181	0111	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1182	0207	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1183	0207	0305	0101	0103	0303	GG	GA
1184	0410	0405	0102	0305	0303	GA	GG
1185	0207	0104	0102	0304	0103	GG	GG
1186	0205	0505	0102	0005	0303	GA	GG
1187	0204	0305	0101	0104	0303	GG	GA

1188	0202	0303	0101	0101	0303	GG	AA
1189	0406	0405	0102	0505	0303	GG	GG
1190	0206	0505	0102	0404	0303	GA	GG
1191	1111	0404	0101	0303	0303	GG	GG
1192	0610	0405	0101	0303	0303	GG	GG
1193	0407	0405	0101	0304	0303	GG	GG
1194	1010	0404	0101	0303	0303	GA	GG
1195	0111	0405	0102	0304	0303	GA	GG
1196	0410	0305	0102	0304	0303	GG	GA
1197	0613	0405	0101	0305	0303	GG	GG
1198	0607	0405	0102	0303	0203	GG	GG
1199	0304	0305	0101	0001	0303	GG	GA
1200	0210	0405	0102	0404	0303	GA	GG
1201	0108	0405	0102	0203	0303	GA	GG
1202	0411	0407	0102	0305	0303	GG	GG

ANEXO 7

Reagentes e Soluções

Extração de DNA

- Tampão para Lise de Eritrócitos (lise I):

Para 1 L de solução:

- 0,3 M de sacarose
- 10mM de Tris-HCl (Ph = 7,5)
- 5,0 mM MgCl
- Triton X -100 1%

Estocagem a 4 ºC

- Tampão para Lise de Leucócitos (lise II):

Para 1 L de solução:

- 0,075 M NaCl
- 0,024 M EDTA

- SDS a 10%

- Perclorato de sódio 5,0 M

- NaCl 6,0 M

- Etanol 70%

Gel e Eletroforese

Solução Estoque de Acrilamida (30%): 29 gramas de Acrilamida e 1 grama de bis-acrilamida diluídas em um volume final de 100 ml de água. Filtrar.
Uréia P.A. (NH_2CONH_2)
Glicerol [$C_3H_5(OH)_3$]
Tampão TBE 10X: Tris/HCl 0,89M pH 8,0; EDTA 0,08M; Ácido Bórico 0,89M.
Persulfato de Potássio: Solução saturada em água.
TEMED (N, N, N',N', tetrametiletilenodiamina)
Tampão de Amostra (loading buffer): TBE 1X; Xileno cianol 0,25%; Azul de Bromofenol 0,25%; EDTA 0,1M pH 8,0; Ficoll 15%.
Formamida 75%

Coloração

- Solução Fixadora*:* 50mL de Álcool Etílico, 2mL de Ácido Acético, água deionizada q.s.p. 300mL.

- Nitrato de Prata*:* Solução a 0,1% em água destilada.

- Formaldeído *37%* para cada 100mL de solução na hora do uso.

- Revelador: 4,5g de NaOH, água deionizada q.s.p. 200 mL.

MICROSSATÉLITES DA REGIÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL EM PACIENTES COM AIDS APRESENTANDO OU NÃO RETINITE PELO CITOMEGALOVÍRUS

Neifi Hassan S Deghaide[1], Maria de Lourdes V Rodrigues[2], Eric C Castelli[1], Celso T Mendes-Júnior[1], Eduardo A Donadi[1].

1- Divisão de Imunologia Clínica, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, 14 049-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil

2- Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo Avenida Bandeirantes 3900, 14 049-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Endereço do autor para correspondência

Laboratório de Imunologia Molecular-LIM
Divisão de Imunologia Clínica, Departamento de Clínica Médica
Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP
Avenida Bandeirantes 3900, 14 048-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil
Fax +55 16 36 336695
e-mail: n.deghaide@bol.com.br

Unitermos: TNF, microssatélites, aids, retinite, citomegalovírus.

RESUMO

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma potente citocina pró-inflamatória que modula as respostas imunes contra infecções virais, estando bastante envolvido na patogenia da aids. O gene que codifica o TNF está localizado na região altamente polimórfica do Complexo Principal de Histocompatibilidade, apresentando seis microssatélites polimórficos (*TNFa-f*). Como os sítios polimórficos têm sido associados com diversas doenças, incluindo infecções virais, câncer e doenças auto-imunes, no presente estudo, avaliamos a freqüência de alguns sítios polimórficos na região do gene que codifica o TNF em pacientes apresentando aids, estratificados de acordo com a presença ou não de retinite por citomegalovírus (R-CMV). Estudamos 52 pacientes com aids e R-CMV, 170 com aids sem R-CMV, e ainda, 202 indivíduos com sorologia negativa para o HIV-1. DNA do sangue periférico foi amplificado e hibridado com iniciadores específicos. A tipificação dos microssatélites do TNF foi realizada de acordo com a mobilidade do DNA amplificado em géis de poliacrilamida. A análise estatística foi realizada, utilizando o teste exato de Fisher bicaudal, considerando significantes valores de $p< 0,05$. Para estimar a força das associações foram também calculados *odds ratio* (OR) e fração etiológica (FE) quando OR > 1,0 e, fração preventiva (FP), quando OR< 1,0. Em comparação com os controles, os alelos *TNFb4* (p = 0,0400; OR= 0,6020; 95% IC= 0,3751-0,9661, FP= 0,1556) e *TNFc1* (p= 0,0144; OR= 0,5739; 95% IC= 0,3688-0,8930; FP= 0,2964) apresentaram freqüências diminuídas nos pacientes com aids e R-CMV, ao passo que o alelo *TNFc2* (p= 0,0144; OR= 1,7425: 95% IC= 1,120-2,711; FE= 0,1844) apresentou freqüência aumentada nos pacientes com aids e R-CMV. Em relação aos controles, os alelos *TNFa5* (p= 0,0146; OR= 2,0638; 95% IC= 1,161-3,669; FE= 0,0500) e *TNFb7* (p= 0,0358; OR= 2,3320 95% IC= 1,069-5,087; FE= 0,0319) apresentaram freqüências alélicas aumentadas no grupo de pacientes com aids sem R-CMV, enquanto que o alelo *TNFb4* (p= 0,0210; OR= 0,6957; 95% IC= 0,5129-0,9436; FP= 0,1190) apresentou freqüência diminuída nos pacientes com aids sem R-CMV. Estes resultados indicam que os alelos *TNFb4 e TNFc1* estão associados com proteção contra o desenvolvimento de R-CMV e o alelo *TNFc2 e*stá associado com a susceptibilidade a R-CMV. Os alelos *TNFa5 e TNFb7* conferiram susceptibilidade para o desenvolvimento de aids, ao passo que o alelo *TNFb4* conferiu proteção contra o desenvolvimento de aids. Este é o primeiro estudo avaliando os alelos dos microssatélites do TNF na aids, apontando diversas associações entre alelos da região do gene que codifica o TNF com aids e também com R-CMV.

SUMMARY

Tumor Necrosis Factor (TNF) is a potent inflammatory cytokine that modulates immune responses against viral infections, actively participating in the pathogenesis of Aids. TNF gene is located within the highly polymorphic Major Histocompatibility Complex, exhibiting six microsatellites (*TNFa-f*). Since polymorphic sites have been associated with disease, in the present study we evaluated the frequency of some polymorphic sites observed in TNF codifying region in patients presenting with Aids, stratified according to the presence or not of retinitis caused by cytomegalovirus (R-CMV). 52 patients with Aids and R-CMV, 170 with Aids without R-CMV, and 202 healthy individuals exhibiting negative serology for HIV-1 were studied. Peripheral blood DNA was amplified and hybridized with specific oligonucleotide primers. TNF microsatellite typing and SNP assessment are performed evaluating to amplified DNA mobility in polyacrilamide gels. Statistical analysis was performed using the two-tailed Fisher's exact test, considered to be significant at $p< 0.05$. The strength of the associations was performed estimating by the *odds ratio* (OR) and the etiologic fraction (EF) when OR > 1,0, and preventive fraction (PF) when OR< 1.0. Compared to controls, the *TNFb4* (p = 0.0400; OR= 0.6020; 95% CI= 0.3751-0.9661, PF= 0.1556) and *TNFc1* (p= 0.0144; OR= 0.5739; 95% CI= 0.3688-0.8930; PF= 0.2964) alleles were underrepresented in Aids patients with R-CMV, conferring protection against R-CMV development. The *TNFc2* (p= 0.0144; OR= 1.7425: 95% CI= 1.120-2.711; EF= 0.1844) and allele was overrepresented in Aids patients with R-CMV, conferring susceptibility to R-CMV. Compared to controls, *TNFa5* (p= 0.0146; OR= 2.0638; 95% CI= 1.161-3.669; EF= 0.0500) and *TNFb7* (p= 0.0358; OR= 2.3320 95% CI= 1.069-5.087; EF= 0.0319) alleles were overrepresented in Aids patients without R-CMV, conferring susceptibility to Aids development, whereas the *TNFb4* (p= 0.0210; OR= 0.6957; 95% CI= 0.5129-0.9436; PF= 0.1190) was underrepresented in Aids patients without R-CMV, protecting against Aids development. This is the first report on the association of Aids and TNF microsatellites, highlighting many associations between the alleles of the TNF region with Aids and also with R-CMV.

INTRODUÇÃO:

A maioria das infecções humanas causadas pelo citomegalovírus (CMV) é assintomática e a grande parte dos adultos possui anticorpos séricos contra o vírus. No entanto, quando ocorre manifestação clínica da infecção, sua apresentação pode ser diversa, levando, por vezes, a um quadro grave, eventualmente fatal. Esse vírus produz alterações morfológicas nas células infectadas, como aumento de tamanho e inclusões virais intranucleares, que conferem a elas um aspecto peculiar ("olho de coruja"). Por essa razão, foi denominada "doença de inclusão citomegálica", mesmo antes de o agente etiológico ter sido identificado (12, 31). Constituem grupos de risco os imunodeprimidos, as gestantes, os indivíduos submetidos a grande número de transfusões e prostitutas (1, 9). O CMV nunca abandona o organismo da pessoa infectada, permanecendo em estado latente e, quando baixa a imunidade do hospedeiro, a infecção pode ser reativada. A infecção por CMV é uma das mais sérias complicações em pacientes infectados pelo HIV com valores de linfócitos T CD4+ inferiores a 50 células/mm^3, já que a reativação do quadro infeccioso está associada à deficiência do sistema imunológico. (12). No passado, a retinite a CMV era uma doença comum associada à aids, conduzindo à cegueira em 30% dos doentes. Isto ocorre principalmente em doentes não tratados, que são frequentemente diagnosticados em primeira linha com HIV (23). A retinite inflamatória causada pelo CMV (R-CMV), geralmente com vitreite severa, ocorre no decurso de imunodeficiência. Se a R-CMV não for diagnosticada e tratada a tempo, a visão do doente está sempre em risco. A alteração da visão está quase sempre associada a lesões, que não são reversíveis mesmo com tratamento adequado. É por isto que a R-CMV permanece sendo uma doença perigosa mesmo na era da quimioterapia anti-retroviral altamente potente (HAART). Esses esquemas de quimioterapia resultaram em significativo aumento na sobrevida dos pacientes (14, 27, 36, 42), mas infelizmente, complicações oculares relacionados à aids continuam a ocorrer, especialmente as infecções oportunistas, que muitas vezes deixam como seqüela a baixa visão ou a cegueira.

O TNF é uma potente citocina pró-inflamatória codificada por um gene localizado no braço curto do cromossomo 6 em humanos (região 6p 21.3), que está arranjado em seqüência com o gene da linfotoxina-α (LT) na chamada região de classe III do Complexo Principal de Histocompatibilidade, entre os genes que codificam as moléculas de classe II, DP, DQ e DR, e as moléculas de classe I, A, B e C (17). Os fagócitos mononucleares (monócitos/macrófagos) ativados são os principais produtores de TNF e os linfócitos, os principais produtores de lifotoxinas. Essas citocinas compartilham os mesmos receptores celulares e possuem as mesmas atividades biológicas, promovendo a quimiotaxia e ativação de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, permitindo a erradicação de microorganismos, e ainda, estão envolvidos nas reações inflamatórias locais. O TNF induz a síntese de outras citocinas inflamatórias como IL-1 e IL-8 e participa como importante regulador da resposta imune inata, estando envolvido em processos patológicos como choque térmico, doenças auto-imunes, replicação viral e outros (2). A região do TNF possui muitas regiões polimórficas, incluindo diversas repetições curtas de nucleotídeos *in*

tandem (s*hort tandem repeats*-STRs), também denominadas de microssatélites, sendo relatados como *TNFa, TNFb, TNFc, TNFd, TNFe e TNFf* (18, 50). Os polimorfismos dos microssatélites do TNF têm sido associados com diversas doenças auto-imunes (15, 16, 30, 39, 48,49), certos tipos de tumores (13, 24, 26, 29, 33, 43, 44) e doenças infecciosas parasitárias (4). Associação entre os microssatélites do gene TNF e a taxa de progressão para aids mostrou que o alelo *TNFc2 c*onferia certa proteção aos pacientes, estando relacionado ao desenvolvimento mais lento da doença. Esse alelo foi mais comum em pacientes com progressão lenta para aids (60%) em relação aos que desenvolveram a doença mais rapidamente (15%) (28). Assim, devido à importância que o TNF desempenha nas respostas imunes inflamatórias, infecciosas, em câncer e doenças auto-imunes, os polimorfismos da região do TNF, incluindo os microssatélites *TNFa, TNFb, TNFc, TNFd e TNFe*, neste estudo foram investigados em pacientes com aids apresentando ou não R-CMV, identificando dessa forma, associações com a susceptibilidade ou proteção para o desenvolvimento da retinite pelo citomegalovírus em pacientes portadores de HIV.

CASUÍSTICA e MÉTODOS

População de estudo

Foi realizado um estudo observacional, tipo caso-controle, no qual, independentemente do grupo a que pertencia, cada paciente com aids, diagnosticado segundo critérios vigentes (6), foi submetido a um exame oftalmológico (com ênfase na oftalmoscopia binocular indireta) e a uma coleta de sangue periférico, para tipificação dos microssatélites do TNF. A população de estudo foi dividida em 4 grupos:

GRUPO I - composto por 52 pacientes com aids e R-CMV, sendo 39 do sexo masculino e 13 do sexo feminino, com idades variando de 21 a 77 anos (mediana = 35 anos),

GRUPO II – constituído por 170 pacientes com aids sem R-CMV, sendo 107 do sexo masculino e 63 do sexo feminino, com idades variando de 21 a 62 anos (mediana = 37anos),

GRUPO III - esse grupo foi constituído pela soma dos pacientes dos Grupos I e II sendo, portanto, composto por 222 pacientes com aids,

GRUPO IV – composto por 202 indivíduos normais, com sorologia negativa para o HIV-1; sendo 146 do sexo masculino e 56 do sexo feminino com idades variando de 18 e 59 anos (mediana = 33 anos).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP.

Tipificação dos microssatélites do TNF

Para a obtenção de DNA utilizou-se o procedimento descrito por MILLER et al (34). A tipificação dos microssatélites foi realizada utilizando os iniciadores descritos pela UDALOVA et al. (50). O volume final da reação de cada amostra foi de 25 ul, incluindo 20 ng de DNA genômico, 20 mM de dNTP (deoxinucleosídeo 5' trifosfato), tampão 10X (0,2 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M KCl), 0,5 U DNA polymerase (Invitrogen), 10 mM de primer do TNF e 50 mM de $MgCl_2$. A mistura foi submetida ao termociclador da Applied Biosystems 9600 para um passo inicial de

desnsturação de 94°C por 5 min, após as amostras foram submetidas a 28 ciclos de 94°C por 1 min, 61°C por 1 min, e 72°C por 1 min, após uma extensão de 72°C de 10 min. Os produtos de amplificação foram submetidos à separação por eletroforese em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poliacrilamida acrescidos de 12% de uréia.

Análise estatística foi realizada, utilizando o teste exato de Fisher bicaudal, considerando significantes valores de p< 0,05. Para estimar a força das associações foram também calculados *odds ratio* (OR) (19) e fração etiológica (FE) quando OR > 1,0 e, fração preventiva (FP), quando OR< 1,0. (47).

RESULTADOS

As freqüências alélicas dos cinco locos foram testadas, sendo encontrados valores significantes para os alelos de microssatélites *TNFa5, TNFb4, TNFb7, TNFc1 e TNFc2*.

TNFa - Considerando as comparações entre as freqüências dos alelos *TNFa* entre pacientes com aids total (grupo III) e grupo controle (grupo IV) observamos que, o alelo *TNFa5* era mais freqüente no grupo III do que no grupo IV (p=0,0308), conferindo OR de 1,849, intervalo de confiança 95% (IC 95%) de 1,059 a 3.227 e uma fração etiológica de 0,0403. Nos pacientes com aids sem R-CMV (grupo II), este alelo também se mostrou mais freqüente quando comparado com o grupo IV (p=0,0146), conferindo OR de 2,0638, IC 95% com intervalo de 1,161 a 3,669 e uma fração etiológica de 0,0500. Quando os pacientes com aids e R-CMV (grupo I) foram comparados com os controles, esse alelo deixou de ser significante (Figura 1).

TNFb - Considerando as freqüências do *TNFb*, observou-se que o *TNFb4* era menos freqüente nos grupos de pacientes com aids e R-CMV (p= 0,040; OR= 0,6020; IC 95% = 0,3751 a 0,9661 e FP = 0,1556), aids sem R-CMV (p= 0,210; OR=0,6957; IC 95%= 0,5129 a 0,9436 e FP= 0,1190) e nos pacientes com aids do grupo total (p= 0,0074; OR= 0,6730; IC 95%= 0,5063 a 0,8946 e FP= 0,1279) quando comparados com indivíduos do grupo controle (Figura 2). O alelo *TNFb7* foi mais freqüente nos paciente com aids sem R-CMV, do que no grupo controle (p= 0,0358; OR= 2,332; IC 95%= 1,069 a 5,087 e FE= 0,0319). As outras comparações não mostraram resultados significantes.

TNFc - Na comparação entre os grupos de pacientes com aids e R-CMV e aids sem R-CMV, o alelo *TNFc1,* tinha sua freqüência diminuída (p= 0,0450; OR= 0,6187; IC 95%= 0,3945 a 0,9702 e FP= 0,2591) nos pacientes com aids e R-CMV. A freqüência deste alelo também permaneceu diminuída no grupo de paciente com aids e R-CMV, quando este foi comparado com o grupo controle (p= 0,0144; OR= 0,5739; IC 95%= 0,3688 a 0,8930 e FP= 0,2964). O alelo do *TNFc2* apresentou freqüência aumentada nos pacientes com aids e R-CMV (p= 0,0450; OR= 1,6164; IC 95%= 1,031 a 2,535 e FE= 0,1650) quando comparado com os pacientes com aids sem R-CMV e freqüência aumentada nos pacientes com aids e R-CMV (p= 0,0144; OR= 1,7425, IC 95%= 1,120 a 2,711 e FE= 0,1844), quando comparado com os indivíduos controle (Figura 3).

TNF d e TNF e - Nenhuma associação foi observada entre alelos dos microssatélites *TNFd* ou *TNFe* com aids ou com R-CMV.

DISCUSSÃO

A aids constitui-se uma das principais e mais graves pandemias do século XX e, segundo o Ministério da Saúde do Brasil, existem cerca de 40 milhões de pessoas vivendo com HIV/aids no mundo. Esse número inclui os 4,9 milhões estimados de pessoas que adquiriram o HIV durante 2004. No Brasil, já foram identificados cerca de 433 mil casos de aids (7). Apesar das diferenças regionais, as infecções oportunistas de maior prevalência em todos os continentes são a pneumonias causadas pelo *Pneumocystis carinii*, a retinite por citomegalovírus e a encefalite por *Toxoplasma gondii* (3). No Brasil, a infecção ocular mais comum em pacientes com aids é a R-CMV, que produz deteriorização da retina com marcada diminuição da acuidade visual se acometer a parte central da retina (8, 10, 21, 22). Apesar dos esforços para conter a evolução fatal da aids, tem-se observado a ocorrência de resistência viral aos medicamentos disponíveis (25). Uma das possibilidades para tentar explicar esta resistência se deve às diferenças individuais que promovem susceptibilidade para a R-CMV (11, 38, 40,41).

O gene do TNF está localizado na região de classe III do CPH, no cromossomo 6p21, e apresenta forte ligação de desequilíbrio com certos alelos da região I e II do CPH, formando haplótipos (18). Associações são importantes nos mecanismos de indução das respostas imunológicas, visto que a molécula HLA é importante para a

ligação de peptídios antigênicos e sua apresentação para linfócitos T. O TNF é uma importante citocina pró-inflamatória relacionada a respostas imunológicas, seja infecciosa ou auto-imune, e em mecanismos metabólicos (18, 45). A relação entre os polimorfismos com algumas patologias pode ser devida à influência direta da variabilidade genética sobre a expressão gênica, ao desequilíbrio de ligação dos genes de citocina com genes adjacentes, ou ainda, influência de outros genes, situados em outros cromossomos, agindo epistaticamente.

Embora o genótipo TNF possa influenciar na reposta do hospedeiro às infecções virais, incluindo neutralização e eliminação dos vírus (17, 20), existem poucos estudos avaliando essa associação em pacientes com aids. Assim, a taxa de deterioração imunológica e progressão para aids diferem entre os indivíduos infectados portadores do HIV-1. Esta progressão pode ser influenciada pelo fenótipo do vírus, pela resposta imune do hospedeiro e por fatores genéticos. Posto que o TNF esteja envolvido na patogenia da aids e, que os microssatélites possam estar implicados na magnitude de expressão do TNF, podendo servir como marcadores de doença, neste estudo, avaliamos o polimorfismo dos cinco microssatélites do TNF, analisando a associação dos microssatélites no desenvolvimento da R-CMV em pacientes com aids ou como marcadores genéticos para aids *per se*.

A freqüência do alelo *TNFa5* apresentou-se aumentada nos pacientes com aids sem R-CMV (9,71% versus 4,95%; p= 0,0146; OR= 2,0638) e também nos pacientes do grupo III, aids total, (8,78% versus 4,95%, p= 0,0308; OR= 1,8489), quando comparados com o grupo controle. Posto que a freqüência desse alelo em pacientes com aids e R-CMV era semelhante àquelas observadas em indivíduo controle, podemos inferir que o alelo *TNFa5* confere susceptibilidade ao desenvolvimento da aids, independentemente da presença da retinite.

O alelo *TNFb4* estava diminuído nos pacientes com: aids e RCMV (27,88% versus 39,11%; p= 0,0400; OR= 0,6020), aids sem R-CMV (30,88% versus 39,11%, p= 0,0210, OR= 0,5129), e ainda, nos pacientes com aids do grupo total (30,18% versus 39,11%; p= 0,0074; OR= 0,6730) em comparação com os indivíduos do grupo controle. Posto que a freqüência desse alelo nos três grupos de pacientes estava diminuída quando comparado com o grupo controle, podemos inferir que o alelo *TNFb4* confere proteção contra o desenvolvimento da aids. Por outro lado, o alelo *TNFb7* teve freqüência aumentada somente nos pacientes com aids sem R-CMV (5,59% versus 2,48%; p= 0,0358; OR= 2,332) quando comparado com o grupo controle. Posto que esse alelo não teve alteração de freqüência nos pacientes com aids do grupo total, estudos posteriores serão necessários para verificar se este alelo possa estar envolvido como fator de susceptibilidade ao desenvolvimento da aids. O *TNFb* têm sido associado com doenças auto-imunes (16, 39).

Na região do microssatélite *TNFc*, o alelo *TNFc1* encontrou-se diminuído nos pacientes com aids e R-CMV (56,73% versus 67,94%; p= 0,0450; OR= 0,6187) quando comparado com pacientes com aids sem R-CMV e nos pacientes com aids e R-CMV (56,73% versus 69,55%; p= 0,0144; OR= 0,5739) quando comparado com indivíduos controles, sugerindo ser este alelo um fator de proteção para o desenvolvimento da retinite por citomegalovírus. Por outro lado, o alelo *TNFc2*, em nosso estudo, mostrou-se associado com a susceptibilidade ao desenvolvimento da R-CMV, pois o alelo estava aumentado nos pacientes com aids e R-CMV quando comparamos com os pacientes com

aids sem R-CMV (43,27% versus 32,06%; p= 0,0450; OR= 1,6164) e com indivíduos controles (43,27% versus 30,45%; p= 0,0144; OR= 1,7425). A freqüência do *TNFc2* embora fosse maior nos pacientes com aids total quando comparado com o grupo controle não foi estatisticamente significante. O alelo *TNFc2* tem sido mostrado apresentar forte diferença entre a média de progressão da infecção pelo HIV, sendo elevada em pacientes que apresentavam uma progressão mais lenta (60,9%) e menor naqueles com progressão mais rápida (15%) da doença (p=0,002; OR= 0,1). Baixa freqüência desse alelo também foi observada no grupo de pacientes apresentando progressão mais rápida da infecção pelo HIV em comparação com grupo controle saudável (15% versus 45,9%, p= 0,006) (28).

Neste estudo, não foram observadas associações significantes entre alelos do microssatélite *TNFd* com susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da R-CMV ou aids. Por outro lado, a tipificação do TNFd tem sido estudada em diversas doenças mediadas por mecanismos imunológicos (5,16, 32, 35, 37). De modo similar, também não foram observadas associações com os alelos do microssatélite *TNFe* com susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da R-CMV. Não existe citação acerca da associação desse alelo com a magnitude de secreção do TNF.

Sumariando, quando consideramos as comparações das freqüências dos alelos dos microssatélites da região do TNF entre o grupo total de pacientes com aids e os controles, observamos que o alelo *TNFb4* conferiu proteção ao passo que os alelos *TNFa5* susceptibilidade ao desenvolvimento da aids. Estratificando o grupo total de pacientes com aids em pacientes portadores do HIV-1 que desenvolveram a retinite por citomegalovírus (R-CMV) e os pacientes com aids que não desenvolveram R-CMV, observamos que o alelo *TNFb4* além de ser marcador de proteção para a aids também conferiu proteção para o desenvolvimento da R-CMV. O alelo *TNFc1* conferiu proteção ao passo que o alelo *TNFc2* susceptibilidade para o desenvolvimento da retinite nos pacientes com aids.

Embora os mecanismos relacionados com a participação do TNF no desenvolvimento da R-CMV não estejam bem esclarecidos, este estudo sugere que fatores imunogenéticos associados com a magnitude de expressão do TNF e, provavelmente da expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, estejam envolvidas no desenvolvimento da R-CMV em pacientes com aids, sendo que estudos posteriores serão necessários para validar os achados deste estudo. Este é o primeiro a avaliar a associação dos microssatélites da região do TNF com a aids e com pacientes portadores do HIV-1 com R-CMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER SP- Transfusion-associated Cytomegalovirus infections. **Rev. Infect. Dis. 5**: 977,1983.
2. AGGARWAL BB, SAMANTA A, FELDMANN M. TNF α. In: Cytokine Reference**. Academic Press**, p. 413-433, 2000.

3. BELFORT Jr R. The ophthalmologist and the global impact of the AIDS epidemic LV Edward Jackson Memorial Lecture. **Am J Ophthalmol.,129:** 1-8, 2000.

4. CAMPELO V, DANTAS RO, SIMÕES RT, MENDES-JUNIOR CT, SOUSA SM, SIMÕES AL, DONADI EA. TNF Microsatellite alleles in Brazilian Chagasic Patients. **Dig Dis Sci, 52:** 334-9, 2007.

5. CAVETJ, MIDDLETON PG, SEGALL M,NOREEN H, DAVIES SM, DICKINSON AM. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphism associated with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. **Blood, 94:** 3941, 1999.

6. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveliance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR - CDC 42**: 1-13, 1993.

7. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Dados e pesquisa em DST e AIDS [online]. **Ministério da Saúde**; 2006. Disponível em: URL: http://www.aids.gov.br.

8. CURI ALL, MURALHA NETO A, MURANAKA E, MURALHA L, VIANNA RNG. Estudo epidemiológico das alterações oftalmológicas na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. **Rev Bras Oftalmol. 58(3):** 223-6, 1999.

9. DOERR, H.W.: BRAUN, R. & MUNK, K. - Human Cytomegalovirus infection. **Recent. Developments in Diagnosis and Epidemiology 63**:241, 1985.

10. DUALIBY PT, SULEIMAN JMAH. Achados oculares em AIDS no Instituto de Infectologia Emílio Ribas antes da introdução das drogas inibidoras de protease. **Rev Bras Oftalmol. 58(5):** 383-7, 1999.

11. FERNANDES AP, GONÇALVES MA, ZAVANELLA RB, et al. HLA markers associated with progression to AIDS are also associated with susceptibility to cytomegalovirs retinits. **AIDS, 17:** 2133-6, 2003.

12. FIGUEIREDO JFC, RODRIGUES MLV, SOUZA NV, ROMÃO E & KRIEGER FTS. Aspectos da aids de interesse para o oftalmologista. **Medicina, Ribeirão Preto 31:** 577-583, 1998.

13. GALLAGHER G, LINDEMANN M, FERENCIK S, WALZ MK, SCHMITZ A, RICHARDS S, ESKDALE J, FIELD M, GROSSE-WILDE H. Association of the TNFa2 microsatellite allele with the presence of colorectal cancer. **Tissue Antigens, 50(1):** 47-51, 1997.

14. GOLDBERG DE, WANG H, AZEN SP, FREEMAN WR. Long term visual outcome of patients with cytomegalovirus retinitis treated with highly active antiretroviral therapy. **Br J Ophthalmol 87:** 853-5, 2003.

15. HAJEER AH.; WORTHINGTON J., SILMAN AJ, OLLIER WE. Association of tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms with HLA-DRB1*04-bearing haplotypes in rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Rheum, 39:**1109, 1996.

16. HAJEER AH, WORTHINGTON J, DAVIES EJ, HILLARBY MC, POULTON K, OLLIER WE. TNF microsatellite a2, b3 and d2 alleles are associated with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens, 49:** 222, 1997.

17. HAJEER A H & HUTCHINSON IV. TNF-α Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications. **Microscopy Research and Technique, 50:** 216-228, 2000.

18. HAJEER AH & HUTCHINSON IV. Influence of TNF-alpha gene polymorphism on TNF Production and disease. **Human Immunology, 62:** 1191-1199, 2001.

19. HENNEKENS CH & BURING JE. **Epidemiology in medicine**. Boston/Toronto, Little Brown, p.54-100, 1987.

20. HOHLER T, KRUGER A, GERKEN G, SCHNEIDER PM, MEYER Z, BUSCHENFELDE KH, RITTNER C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. **J Med Virol, 54(3):**173-7, 1998.

21. JABS DA, GREEN WR, FOX R, POLK FB, BARTLETT JG. Ocular manifestations of acquired immune deficiency syndrome. **Ophthalmology. 96(7):** 1092-9, 1989.

22. JABS DA, MARTIN BK, FORMAN MS, et al. Cytomegalovirus (CMV) blood DNA load, CMV retinitis progression, and occurrence of resistant CMV in patients with CMV retinitis. **J Infect Dis., 192:** 640-9, 2005.

23. JACOBSON MA, STANLEY H, HOLTZER C, et al. Natural history and outcome of new AIDS-related cytomegalovirus retinitis in the era of HAART. **Clin Inf Dis 30:** 231-3, 2000.

24. JUSZCZYNSKI P, KALINHA E, BIENVENU J, WOSZCZEK G, BOROWIEC M,ROBAK et al. Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. **Blood 100:** 3037-40, 2002.

25. KANTOR R, SHAFER RW, FOLLANSBEE S, TAYLOR J, SHILANE D, HURLEY L. Evolution of resistance to drugs in HIV-1 infected patients failing antiretroviral therapy. **AIDS. 18(11):**1503-11, 2004.

26. KASEM H, GALLAGHER G, OH HH, STUART R C. Increased TNFa2 microsatellite allele frequency in proximal gastric adenocarcinoma. **Gastroenterology, 114(2):**2542, 1998.

27. KEMPEN J.H., MIN YI. FREEMAN W.R., et al. Risk of immune recovery uveitis in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis**. Ophthalmology 3:** 684-94, 2006.

28. KHOO SH, PEPPER L, SNOWDEN N, HAJEER A H, VALLELY P, WILKINS E G, MANDAL BK, OLLIER WE. Tumor necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression. **Aids, 11(4):** 423-8, 1997.

29. MARSH HP, HALDAR NA, BUNCE M, MARSHALL SE, LE MONIER K, WINSEY SL, CHRISTODOULOS K, CRANSTON D, WELSH KI, HARRIS AL. Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation. **Br J Cancer, 89**: 1096-1101, 2003.

30. MARTINEZ A, FERNANDEZ-ARQUERO M, PASCUAL-SALCEDO D, CONEJERO L, ALVES H, BALSA A, CONCHA, EG. Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum, 43:** 1366-70, 2000.

31. MARTINS MC, BURNIER JR M, MUCCIOLI C & BELFOR JR R. Achados anatomopatológicos nas manifestações oculares da aids. In: MUCCIOLI C & BELFORT JR R. **Manifestações oculares da aids**. Rio de Janeiro, Cultura Médica, p. 22-31, 1999.

32. MATTEY DL, HAJEER AH, DABABNEH A, et al. Association of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica with different tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms. **Arthritis & Rheumatism, 43(8):** 1749-1755, 2000.

33. MATTHIAS C, JAHNKE V, FRYER A, STRANGE R, OLLIER W, HAJEER A. Influence of tumour necrosis factor microsatellite polymorphisms on susceptibility to head and neck cancer, **Acta Otolaryngol, 118(2):**284-8, 1998.

34. MILLER AS, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. **Nucleic Acids Res, 16:**1215, 1988.

35. NORDLANDER, A., UZUNEL, M., MATTSON, J., REMBERGER, M. The TNFd4 allele is correlated to moderate-to-severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. **British J Haemol, 119,** 1133-1136, 2002.

36. PALELLA FJ Jr, DELANEY KM, MOORMAN AC, LOVELESS MO, FUHRER J, SATTEN GA. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N **Engl J Med. 338(13):** 853-60, 1998.

37. POCIOT F, BRIANT L, JONGENEEL CV, MOLVIG J, WORSAAE H, ABBAL M, THOMSEN M, NERUP J, CAMBON-THOMSEN A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Immunol, 23(1):** 224-31, 1993.

38. PRICE P, KEANE NM, STONE SF, et al. MHC haplotypes affect the expression of opportunistic infections in HIV patients. **Hum Immunol,62:**157-64, 2001.

39. RASSI DM, WASTOWSKI IJ, SIMÕES RT, RODRIGUES S, DEGHAIDE NHSD, MENDES-JUNIOR CT, SIMÕES AL, SOARES CP, PASSOS GAS AND DONADI EA. TNFa-e microsatellite, HLA-BRB1 and DQB1alleles and haplotypes in brazilian patients presenting recently diagnosed type 1 Diabetes Mellitus**. Ann. N.Y.Acad.Sci. 1079:** 300-304, 2006.

40. RODRIGUES MLV, FIGUEIREDO JFC, DEGHAIDE NHS, et al. Frequency of HLA class 1 and 2 alleles in Brazilian patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis. **Acta Ophthalmol Scand,81:** 514-6, 2003.

41. RODRIGUES MLV, DEMARCO ALG, FIGUEIREDO JF, SOUZA NV, DEGHAIDE NHS, ROMÃO E, DONADI EA. HLA-B35 antigen is associated to susceptibility to ocular infections in patients with AIDS. **Ophthalmiic Research 36(S1):**86, 2004.

42. RODRIGUES ML, RODRIGUES,MLV, FIGUEIREDO JFC, FREITAS JAAH. Ocular problems in brazilian patients with aids before and in highly antiretroviral therapy (HAART) era. **Braz. J Infect Dis. 11(2):** 2007.

43. SIMOES RT, BETTINI JS, SOARES EG, DUARTE G, GONCALVES MA, SIMOES AL. Tumour necrosis factor microsatellite association with human papillomavirus cervical infection. **Mol Pathol. Oct;56(5):** 305-6, 2003.

44. SIMOES RT, GONCALVES MA, DONADI EA, SIMOES AL, BETTINI JS, DUARTE G, QUINTANA SM, CARVALHO MW, SOARES EG. Association of tumor necrosis factor a-2 and a-8 microsatellite alleles with human papillomavirus and squamous intraepithelial lesions among women in Brazil. **J Clin Microbiol. Aug;43(8):** 3932-7, 2005.

45. SKOOG T, ERIKSSON P, HOFFSTEDT J, RYDEN M, HAMSTEN A, ARMER P. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) polymorphisms-857C/A and -863C/A are associated with TNF-alpha secretion from human adipose tissue. **Diabetologia. May;44(5):** 654-5, 2001.

46. STURFELT, G., HELLMER, G., TRUEDSON, L. TNF microsatellites in systemic lupus erythematosus – a high frequency of the TNFabc 2-3-1 haplotype in multicase SLE families. ***Lupus,*** **Dec, 5(6):** 618-22, 1996.

47. SVEJGAARD A –HLA and Disease. In: ROSE MR, FRIEDMAN, J & FABRIN JC, ed, Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3ed. Washington, Noel Rose and Herman Friedman, p. 912-920, 1986.

48. TAKEUCHI F, NABETA H, FUSSEL M, CONRAD K, FRANK KH .Association of the TNFa13 microsatellite with systemic sclerosis in Japanese patients. **Ann Rheum Dis. Apr; 59(4):** 293-6, 2000.

49. TARASSI K, CARTHY D, PAPASTERIADES C, BOKI K, NIKOLOPOULOU N, CARCASSI C, OLLIER WE, HAJEER, AH: HLA-TNF haplotype heterogeneity in Greek SLE patients. **Clin Exp Rheumatol, 16:** 66, 1998.

50. UDALOVA IA, NEDOSPOASOV SA. WEBB GC, CHAPLIN DD, URESTSKAYA RL. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. **Genomics, 16:** 180-186, 1993.

FiIGURAS E LEGENDAS

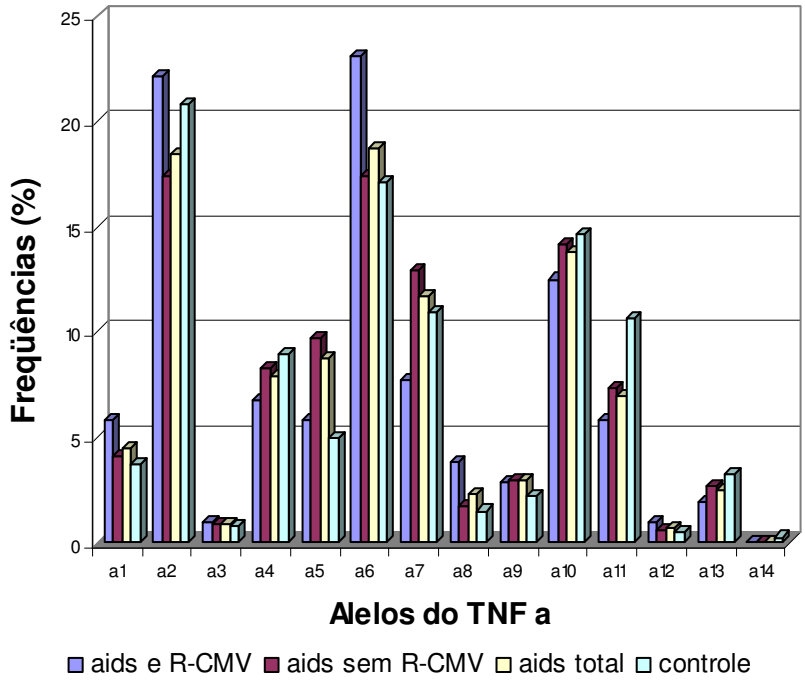


Figura 1 – Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFa

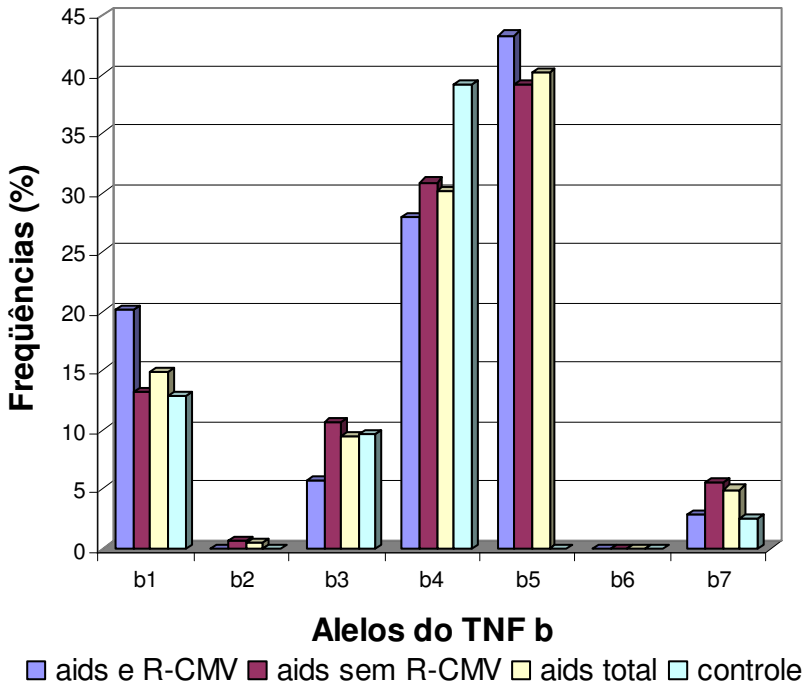


Figura 2 – Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFb

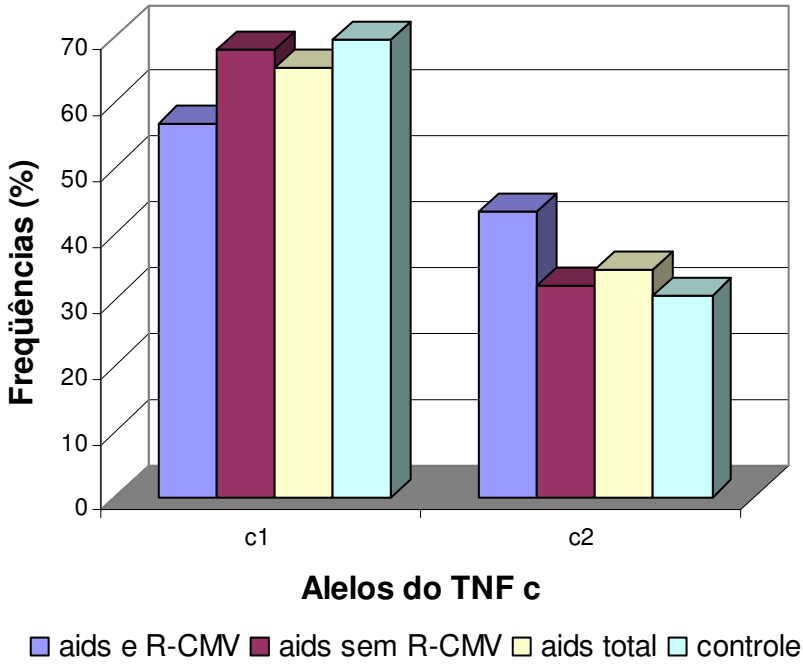


Figura 3 – Distribuição das freqüências alélicas para o loco TNFc

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo