



## **ESTUDO DAS FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE TNF DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS, PARA ASSOCIAÇÃO COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS**

Fernanda De Cesare Quintero (PIBIC/CNPq/UEM), Luciana Conci Macedo, Ana Maria Sell (Co-orientadora), Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientadora), e-mail: f.dcquintero@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá /Centro de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

### **Ciências Biológicas – Imunologia – Immunogenética**

**Palavras-chave:** Polimorfismo, TNF, Neoplasias mieloproliferativas crônicas

#### **Resumo:**

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPCs) são neoplasias originadas por uma proliferação clonal de um progenitor hematopoiético pluripotente levando ao acúmulo de células de linhagem mieloide maduras. Dentre NMPCs BCR-ABL negativas destacamos a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MFP), que comumente apresentam a mutação JAK2 V617F. Estudos tem demonstrado tanto uma produção aumentada de algumas citocinas inflamatórias em pacientes que apresentam a mutação JAK2 V617F, como também a influência da quinase JAK2 V617F na expressão do TNF- $\alpha$ . Polimorfismos, em particular na posição -308 do promotor do TNF- $\alpha$ , têm sido reportados como capazes de alterar a expressão dessa citocina. Em estudo prévio, foram investigados os genes de polimorfismos da citocina TNF-238 e TNF-308 associada com a mutação V617F do gene JAK2 em pacientes portadores de NPMCs, assim o objetivo desse trabalho foi de verificar a frequência em uma população saudável para comparação das frequências genotípicas encontradas. Observou-se um aumento significativo de frequência do genótipo G/A nas posições -238 e -308 entre os pacientes frente aos controles, demonstrando uma associação desses polimorfismos à susceptibilidade à doença na população estudada.

#### **Introdução**

As NMPCs são neoplasias originadas por uma proliferação clonal de um progenitor hematopoiético pluripotente levando ao acúmulo de células de linhagem mieloide maduras. William Dameshek descreveu a relação



existente entre a PV, a TE e a MF, propondo que essas doenças, juntamente com a leucemia mieloide crônica (LMC) e a eritroleucemia, fossem agrupadas em uma categoria geral de síndromes mieloproliferativas. A descoberta do gene de fusão BCR-ABL – produto da translocação recíproca entre o braço longo dos cromossomos 9 e 22 – trouxe novas possibilidades à compreensão da origem das NMPc. Atualmente, a PV, a TE e a MFP são denominadas NMPcs BCR-ABL negativas. A presença da mutação JAK2 V617F é considerada critério de maior importância para o diagnóstico de PV, e, na TE e MFP representa um marcador clonal; tal mutação foi observada em aproximadamente 95% dos casos de PV e 50% dos casos de TE e MDP, e consiste na troca de uma valina por uma fenilalanina na posição 617 (V617F) no JAK2 quinase.

Citocinas e fatores de crescimento utilizam as proteínas da família JAK quinase para a propagação de sinais intracelulares. O TNF- $\alpha$  é uma dessas citocinas; tem sido implicado numa variedade de doenças, tanto autoimunes quanto infecciosas e é produzido em maior quantidade por pacientes que apresentam a mutação JAK2 V617F. Polimorfismos, em particular na posição -308 do promotor do TNF- $\alpha$ , têm sido reportados como capazes de alterar a expressão dessa citocina; já foi demonstrado que o alelo TNF2 é um ativador transcricional muito mais forte do que o alelo comum TNF1 numa linhagem de linfócitos B humanos. O objetivo do presente projeto será de verificar a frequência dos polimorfismos TNF 238 e TNF 308 em indivíduos saudáveis doadores de medula óssea e comparar com os pacientes de neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL negativas verificando uma possível associação com a doença.

## **Materiais e métodos**

### *Extração de DNA*

O DNA de 123 indivíduos saudáveis foi extraído a partir de amostras de sangue pelo método de extração com coluna Kit QIAamp (Qiagen®, Chatsworth, CA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

### *Pesquisa do Polimorfismo do TNF-238 e TNF-308*

Os polimorfismos TNF-238 e TNF-308 foram avaliados utilizando o método de RFLP após a amplificação das sequências por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para a posição -308 foi encontrado um fragmento de 107 pares de base quando a variante esteve presente, e fragmentos de 87 e 20 pares de base para o alelo normal. Para a posição-238, um fragmento de 152 pares de base quando a variante esteve presente, e fragmentos de 133 e 19 pares de base para o alelo normal.



### *Análise estatística*

A frequência genotípica e alélica foi obtida por contagem direta, após organização dos dados. Através do teste do qui-quadrado, utilizando-se uma tabela de contingência 2x2, ou pelo Teste Exato de Fisher, foram realizadas comparações das frequências fenotípicas destes genótipos e alelos com os resultados obtidos em projeto anterior que avaliou pacientes portadores NMPCs.

### **Resultados e Discussão**

Foram analisadas as genotipagens das amostras de 123 indivíduos saudáveis para o polimorfismo de TNF nas posições -238 e -308. Os resultados estão descritos na Tabela 1 abaixo. Os dados obtidos foram comparados à frequência dos diferentes genótipos e alelos obtidos na avaliação prévia de 123 pacientes com NMPCs.

**Tabela 1 - Distribuição dos genótipos do TNF-238 e do TNF-308 em pacientes com NMPC e indivíduos saudáveis**

TNF	Controles (n=123)		Pacientes (n=123)	
	TNF-238	TNF-308	TNF-238	TNF-308
<b>Genótipos</b>				
G/G	85	109	101	67
G/A	36	12	22	53
A/A	2	2	0	3
<b>Alelos</b>				
G	206	230	224	187
A	40	16	22	59

Observou-se uma associação significativa entre a frequência do genótipo G/A do TNF -238 considerando todos os pacientes com NMPCs em comparação com o grupo controle (OR = 2,21; IC 95% = 1,02-4,80; P<0,04), bem como do TNF -308 (OR = 1,82; 95% CI = 1,07-3,10; P<0,02).

### **Conclusões**

Polimorfismos no gene promotor do TNF tem sido muito estudados como potencial fator determinante para a susceptibilidade à inúmeras doenças. Os dados obtidos demonstraram que polimorfismos em regiões promotoras de TNF -238 G/A e TNF -308 G/A foram significativamente associados a um risco aumentado à NPMC na população estudada, desencadeados ela mutação JAK2 V617F, de 2,21 e 1,82 respectivamente.



O papel das citocinas na iniciação e progressão nas NMPCs vem sendo estudado, e novas terapias de combinação propostas para o tratamento da doença, tais como inibidores JAK1/2 com interferon e modificadores epigenéticos.

Pequenos polimorfismos de nucleotídeos em citocinas podem exercer funções complexas e interagir uns com os outros, o que pode alterar o efeito dos polimorfismos do TNF -238 e -308 na patogênese das NMPCs. Assim, outros polimorfismos devem ser levados em consideração para determinar o verdadeiro efeito dos fatores de risco para a doença.

### **Agradecimentos**

Agradeço ao CNPq e à UEM, pelo fomento; a minha orientadora, Jeane Visentainer, pelo voto de confiança; a Luciana C. Macedo e a toda a equipe do Laboratório de Imunogenética da UEM, pela ajuda.

### **Referências**

CHAUFFAILLE, M. L. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. **Rev. Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, vol.32, n.4, p. 308-316, 2010.

FLEISCHMANN, A. G., AICHBERGER, K. J., LUTY, S. B., BUMM, et al. TNF-alfa facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 24, p. 6392-6398, 2011.

GHORESCHI, K., GADINA, M. JACKpot! New small molecules in autoimmune and inflammatory diseases. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 1, p. 7-11, 2014.

RUA, C., SANTOS, T., RAMIREZ, E., OLABARRÍA, M. D., et al. **Evolução da Biologia Molecular nos Síndromes Mieloproliferativas**. Tese de Bacharelado. Universidade Atlântica, Lisboa, 2010.

WILSON, A. G., SYMONS, J. A., MCDOWELL, T. L., MCDEVITT, H. O., & DUFF, G. W. Effects of a polymorphism in the human necrosis factor alfa promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 3195-3199, 1997.