

Artigo / Article

## Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos genéticos de *TNF* e *IL2*

### *Optimization of the PCR-SSP methodology in the identification of TNF and IL2 genetic polymorphisms*

Danilo A. S. Franceschi<sup>1</sup>Dangelo O. Viel<sup>2</sup>Ana Maria Sell<sup>3</sup>Luíza T. Tsuneto<sup>3</sup>Jeane E. L. Visentainer<sup>3</sup>

A análise de polimorfismos únicos de nucleotídeos (SNPs) de citocinas pode ser útil em estudos de frequências alélicas e genotípicas em populações saudáveis de diversas regiões, em estudos de associação com doenças infecciosas ou autoimunes, em estudos antropológicos e na evolução pós-transplante. Estes SNPs podem ser avaliados por diferentes métodos moleculares. O objetivo deste estudo foi aperfeiçoar uma metodologia PCR-SSP simples e rápida para a genotipagem de três SNPs de citocinas usando um único teste laboratorial. Para a identificação de *IL2*-330T/G e *IL2*+166G/T foram utilizados dois procedimentos na mesma genotipagem, cada um baseado no uso de quatro iniciadores. Para a detecção de *TNF*-238G/A foram utilizados dois iniciadores que amplificam a guanina e adenina na posição -238. Este estudo permitiu aperfeiçoar um método simples e rápido para identificar três SNPs de citocinas num único teste, podendo ser utilizado em qualquer laboratório de biologia molecular, como alternativa ao uso de kits de alto custo. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;**31**(4):241-246.

**Palavras-chave:** Citocinas; *IL2*; metodologia; polimorfismos únicos de nucleotídeos; *TNF*.

### Introdução

Citocinas são participantes efetivos na patogênese de diversas doenças, como câncer, doenças metabólicas, infecciosas e autoimunes, assim como em condições inflamatórias.<sup>1-3</sup> Elas também são mediadores de respostas imunológicas produzidas em situações de rejeição e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), após transplante de órgãos sólidos<sup>4</sup> e células progenitoras hematopoéticas,<sup>5</sup> respectivamente.

Estudos de genes de citocinas mostraram que diversos polimorfismos em regiões reguladoras destes genes podem ser responsáveis por alterações na produção destas cito-

cinas.<sup>6-11</sup> A maioria deles são do tipo polimorfismos únicos de nucleotídeos (SNPs) em regiões promotoras e no próprio éxon, além de microssatélites em regiões intrônicas.

Vários estudos mostraram a importância dos SNPs na ocorrência de doenças infecciosas,<sup>12</sup> autoimunes,<sup>13</sup> no curso do transplante<sup>14-18</sup> e no estudo de frequências alélicas populacionais.<sup>19,20</sup> A associação de SNPs com doenças humanas tem um grande potencial para a direta aplicação clínica, por prover novos e mais acurados marcadores genéticos para o diagnóstico e prognóstico e, possivelmente, para novos alvos terapêuticos.

Vários métodos baseados na PCR (*polymerase chain reaction*) foram desenvolvidos e utilizados para detecção

<sup>1</sup>Farmacêutico-Bioquímico do Laboratório de Histocompatibilidade – Maringá-PR.

<sup>2</sup>Aluno da Faculdade de Medicina – Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá-PR.

<sup>3</sup>Professora de Imunologia – Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá-PR.

Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá - PR.

**Correspondência:** Jeane Eliete Laguila Visentainer

Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Análises Clínicas

Avenida Colombo, 5790

87020-900 – Maringá-PR – Brasil

Tel: (55 44) 3261-4864 – Fax: (55 44) 3261-4931

E-mail: jelvisentainer@uem.br; jelvisentainer@gmail.com

Doi: 10.1590/S1516-84842009005000055

destes polimorfismos: a metodologia RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), que utiliza enzimas de restrição,<sup>12</sup> o método SSOP (*sequence-specific oligonucleotide probes*), que permite a amplificação do gene e a hibridização de alelos específicos com sondas marcadas<sup>7</sup> e a técnica de SSP (*sequence-specific primers*), a qual faz uso de iniciadores específicos para a sequência de nucleotídeos do alelo polimórfico.<sup>21</sup>

O objetivo deste estudo foi aperfeiçoar uma técnica PCR-SSP de fácil e rápida execução para a genotipagem de três SNPs de citocinas num único teste.

## Material e Métodos

### Amostras de DNA

Os DNAs usados durante a padronização da metodologia foram obtidos de células do sangue periférico de dois voluntários do Laboratório de Imunogenética de nossa instituição, usando o kit de extração EZ-DNA (Biological Industries®, Kibbutz Beit Haemek, Israel) de acordo com as instruções do fabricante. Amostras de DNA de seis indivíduos portadores de genótipos conhecidos dos genes *TNF* e *IL2* foram cedidas por um laboratório brasileiro (Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil) e um da Inglaterra (Department of Histocompatibility and Immunogenetics, London, England) para validação do método. As concentrações de DNA foram determinadas por meio de um espectrofotômetro (Perkin-Elmer®, SP, Brasil) e corrida em gel de agarose a 2,5%. Após a extração, o DNA foi mantido à temperatura de -20°C até o momento do uso.

Posteriormente, o método foi utilizado na genotipagem de 102 amostras de indivíduos saudáveis não aparentados em um estudo publicado recentemente,<sup>18</sup> as quais foram obtidas com o kit de extração EZ-DNA (Biological Industries®, Kibbutz Beit Haemek, Israel).

### Protocolo de genotipagem PCR-SSP de três SNPs de citocinas e validação

Os genótipos para os genes *TNF* e *IL2* foram determinados utilizando-se a técnica PCR-SSP, com sequências específicas de iniciadores sintetizados pela Invitrogen® (SP, Brasil). O método foi validado pela completa concordância com as amostras de genotipagens conhecidas, fornecidas por dois laboratórios distintos de histocompatibilidade (*TNF*-238GG GA, AA e *IL2*-330GG TG, TT).

Neste estudo, estabelecemos esta mistura de reação: 100-150 ng/μL de DNA, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X tampão PCR (Invitrogen®, SP, Brazil), 0,5U de Taq polimerase (Invitrogen®, SP, Brazil) e iniciadores (Tabelas 1-3). Todas as amplificações (13 μL PCR) foram realizadas em um termociclador 9600 da Perkin-Elmer® (SP, Brasil): um ciclo de 96°C (130s), um ciclo de 63°C (60s), nove ciclos de 96°C (10s) e 63°C (60s), vinte ciclos de 96°C (10s), 59°C (50s) e 72°C (30s).

Tabela 1. Volumes de reação recomendados e concentrações finais de componentes da PCR para a detecção do polimorfismo IL2-330

Componentes	Volume (μL)	Concentração Final
Tampão de reação 10X	1,3	1X
MgCl <sub>2</sub> , 50 mM	0,8	2 mM
dNTP, 2 mM	1,3	0,2 mM
Iniciador P1, 7,7 μM	1,5	888 nM
Iniciador GR, 7,7 μM	1,5	888 nM
Iniciador P5, 1,54 μM	1,3	154 nM
Iniciador TF, 1,54 μM	2,6	308 nM
Taq polimerase, 5 U/μL	0,1	0,5 U
DNA (100-150 ng/μL)	1,3	10-15 ng/ μL
Água livre de nucleases q.s.p.	13	

P1: TGAAACAGGAAACCAATACACT  
 GR: AACTCAGAAAATTTCTTAGTCC  
 P5: CAAGACTTAGTGCAATGCAAG  
 TF: TCACATGTTCACTGTAGTATTAT

Os produtos amplificados de PCR foram, então, visualizados pela eletroforese no gel de agarose a 2,5% com brometo de etídeo e fotodocumentados com o equipamento BioDoc-It<sup>†</sup> Imaging System (UVP Upland, CA, USA).

### Detecção dos polimorfismos T/G e G/T nas posições -330 e +166, respectivamente, do gene IL2

A detecção do polimorfismo de *IL2* (-330 G/T) baseou-se em um conjunto de quatro iniciadores de acordo com Reynard *et al.*,<sup>21</sup> com modificações (Tabela 1). Na presença da guanina no produto do sítio polimórfico, os iniciadores P1 e GR produzem um produto de 143pb, enquanto os iniciadores P5 e TF produzem um produto de 447pb se a timina estiver presente.

Para a identificação dos polimorfismos de *IL2* (-330T/G, +166G/T), selecionamos outro método alelo-específico baseado na PCR, o qual permitiu a genotipagem destes dois SNPs em conjunto (Tabela 2). Nesta técnica, foram utilizados iniciadores descritos no Manual for Cytokine Genotyping by the PCR-SSP Method desenvolvido durante o 13<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop and Conference (Seattle, USA, 2002).<sup>22</sup> Os iniciadores 1 e 4 amplificam a timina na posição -330 e guanina na posição +166 e produzem um fragmento de 562pb. Os iniciadores 2 e 5 amplificam a guanina na posição -330 e a guanina na posição +166 e produzem um fragmento de 564pb. Os iniciadores 2 e 6 amplificam a guanina na posição -330 e timina na posição +166 e produzem um fragmento de 569pb. Os iniciadores 3 e 6 amplificam a timina na posição -330 e a timina na posição +166 e produzem um fragmento de 569pb. Um par de iniciador controle que amplifica uma parte do éxon 3 do gene de HLA-B e produz um fragmento 256pb foi adicionado em todos os tubos.

Tabela 2. Volumes de reação recomendados e concentrações finais de componentes da PCR para a detecção dos polimorfismos *IL2-330/+166*

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final	Volume (µL)	Concentração Final	Volume (µL)	Concentração Final	Volume (µL)	Concentração Final
Tampão de reação 10X	1,3	1X	1,3	1X	1,3	1X	1,3	1X
MgCl <sub>2</sub> , 50 mM	0,8	2mM	0,8	2 mM	0,8	2 mM	0,8	2 mM
dNTP, 2 mM	1,3	0,2 mM	1,3	0,2 mM	1,3	0,2 mM	1,3	0,2 mM
P1, 8 µM	2,6	1,6 µM	-	-	-	-	-	-
P2, 8 µM	-	-	1,3	800 nM	3,9	2,4 µM	-	-
P3, 8 µM	-	-	-	-	-	-	1,3	800 nM
P4, 8 µM	1,3	800 nM	-	-	-	-	-	-
P5, 8 µM	-	-	1,3	800 nM	-	-	-	-
P6, 8 µM	-	-	-	-	3,9	2,4 µM	1,3	800 nM
C1, 5 µM	0,26	160 nM	0,26	160 nM	0,26	160 nM	0,26	160 nM
C2, 5 µM	0,26	160 nM	0,26	160 nM	0,26	160 nM	0,26	160 nM
Taq polimerase (5U/µL)	0,1	0,5 U	0,1	0,5U	0,1	0,5U	0,1	0,5U
DNA (100-150 ng/µL)	1,3	10-15 ng/µL	1,3	10-15 ng/µL	1,3	10-15 ng/µL	1,3	10-15 ng/µL
Água livre de nucleases q.s.p.	13		13		13		13	

P1: ACA ATA TGC TAT TCA CAT GTT CAG TGT AGT TTT AT

P2: ACA ATA TGC TAT TCA CAT GTT CAG TGT AGT TTT AG

P3: CAC AAT ATG CTA TTC ACA TGT TCA GTG TAG TTT TAT

P4: TTA ATT CCA TTC AAA ATC ATC TGT AAA TCC AGC

P5: ATT AAT TCC ATT CAA AAT CAT CTG TAA ATC CAG C

P6: ACT TAC ATT AAT TCC ATT CAA AAT CAT CTG TAA ATC CAG A

C1: ATG ATG TTG ACC TTT CCA GGG C2: TTC TGT AAC TTT TCA TCA GTT GC

Tabela 3. Volumes de reação recomendados e concentrações finais de componentes da PCR para a detecção do polimorfismo *TNF-238*

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final	Volume (µL)	Concentração Final
10X Reaction Buffer	1,3	1X	1,3	1X
MgCl <sub>2</sub> , 50 mM	0,8	2 mM	0,8	2 mM
dNTP, 2 mM	1,3	0,2 mM	1,3	0,2 mM
C1, 5 µM	1,3	500 nM	1,3	500 nM
D, 5 µM	1,3	500 nM	1,3	500 nM
712, 5 µM	2,6	1µM	-	-
713, 5 µM	-	-	2,6	1µM
Taq polimerase, 5 U/µL	0,1	0,5U	0,1	0,5U
DNA (100-150 ng/µL)	1,3	10-15 ng/µL	1,3	10-15 ng/µL
Água livre de nucleases q.s.p.	13		13	

712: GAA GCA CCC CCT CGG AAT CG

713: GAA GCA CCC CCT CGG AAT CA

C1: TCT CGG GTT TCT TCT CCA TCG

D: GAG TCT CCG GGT CAG AAT GA

*Detecção do polimorfismo G/A na posição -238 do gene TNF*

Nós selecionamos um método alelo-específico baseado na PCR para a detecção do polimorfismo genético na região promotora de *TNFA-238* (G/A) com algumas modificações.<sup>23</sup> Detalhes podem ser vistos na Tabela 3. Dois iniciado-

res foram preparados, um para a amplificação de um produto com guanina na posição - 238 (712) e outro com adenina (713), de acordo com Fanning *et al.* (1997).<sup>24</sup> Incluímos dois controles (C1 e D) em todas as reações. Os iniciadores 712 e 713 produzem um fragmento de 104pb e C1 e D amplificam um fragmento de 532pb.

**RResultados e Discussão**

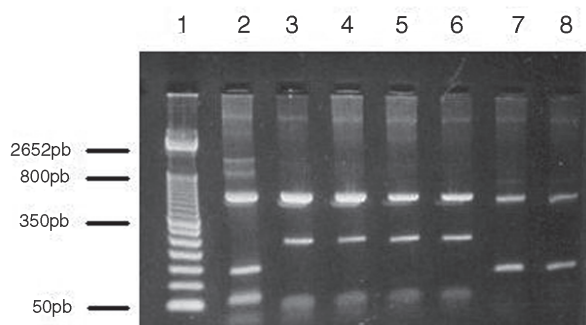
A fonte mais abundante de variação genética no genoma humano é representada pelos SNPs, os quais podem contribuir para a susceptibilidade a doenças comuns e prover informações mais acuradas que facilitarão o diagnóstico precoce, prevenção e tratamento destas doenças humanas.

Neste estudo, houve a possibilidade de desenvolvimento de um método PCR-SSP de genotipagem de três SNPs num único teste, cujo resultado após a corrida em gel de agarose pôde ser visualizado pela foto realizada em câmera polaróide (Figura 1).

Os SNPs escolhidos foram aqueles referentes à posição -238 do gene *TNF* e -330/+166 do gene *IL2*. Alguns destes SNPs já foram associados com a síntese das citocinas pró-inflamatórias IL-2<sup>10</sup> e TNF- $\alpha$ .<sup>33</sup> Estas citocinas são importantes mediadores de respostas imunológicas e inflamatórias frente a várias situações de doenças<sup>25-28</sup> e complicações pós-transplante.<sup>5,29</sup>

A distribuição dos genótipos e alelos de 102 doadores de medula óssea saudáveis, provenientes do estado de São Paulo, determinados por este método, pode ser vista na Tabela 4. Para *TNF*-238, o genótipo homocigoto GG foi o mais frequente, enquanto para *IL2*-330 e *IL2*+166 foram os genótipos heterocigotos TG e GT, respectivamente.

O gene do *TNF* está localizado no cromossomo 6, na região do complexo principal de histocompatibilidade. O SNP localizado na posição -238 da região promotora do gene *TNF* já foi associado com várias doenças, tais como o lúpus eritematoso sistêmico,<sup>30</sup> psoríase,<sup>25</sup> hepatite B,<sup>31</sup> pênfigo foliáceo<sup>32</sup> e doença do enxerto contra o hospedeiro após o transplante de células progenitoras hematopoéticas.<sup>18</sup>



Os números entre parênteses representam as reações com iniciadores para a amplificação de: (1): Ladder (Invitrogen, SP, Brasil); (2): *IL2*-330, bandas específicas para G (447pb) e A (143pb). (3-6): *IL2*-330/+166, banda do controle de parte do gene de HLA-B (256pb) em todos e bandas específicas para T/G (562pb), G/G (564pb), G/T (569pb) e T/T (569pb), respectivamente. (7,8) *TNF*-238, banda do controle de 532pb e bandas específicas para G e A (104pb), respectivamente.

Figura 1. Produtos PCR visualizados por separação eletroforética em gel de agarose

Tabela 4. Frequências genotípicas e alélicas de *TNF*-238 e *IL2*-330/+166 em uma população saudável de doadores de medula

Gene	Genótipo/ Alelo	Frequências	
		n	%
N = 102			
<i>TNF</i> -238	GG	80	78,4
	GA	22	21,6
	AA	0	0
	G	182	89,2
	A	22	10,8
N = 102			
<i>IL2</i> -330	TT	36	35,3
	TG	66	64,7
	GG	0	0
	T	138	67,6
	G	66	32,4
N = 99			
<i>IL2</i> +166	GG	20	20,2
	GT	79	79,8
	TT	0	0
	G	119	60,1
	T	79	39,9

Embora uma exata influência da variante *TNF*-238A na produção de *TNF*- $\alpha$  não esteja completamente estabelecida, a localização deste polimorfismo na região reguladora sugere que ele possa estar associado com uma maior produção desta citocina.<sup>33</sup>

O gene *IL2* está localizado no cromossomo 4, sendo que dois SNPs, um na posição -330 e o outro na posição +166, foram descritos.<sup>10</sup> O SNP na posição -330 foi relacionado à produção aumentada de IL-2 em indivíduos homocigotos GG quando comparados com homocigotos TT. Este polimorfismo foi encontrado estar associado a várias doenças<sup>34,35</sup> e a complicações pós-transplante.<sup>18,29,36</sup> O polimorfismo na posição +166 é uma mutação silenciosa, ou seja, não afeta a sequência de aminoácidos.

**Conclusões**

Este estudo permitiu a padronização de uma técnica PCR-SSP de genotipagem simultânea de três polimorfismos únicos de genes de citocinas de fácil e rápida execução. O método poderá ser aplicado em estudos populacionais de frequências de SNPs e em estudos de associações com doenças e complicações pós-transplante por laboratórios de Biologia Molecular.

**Abstract**

The analysis of cytokine single nucleotide polymorphisms (SNPs) can be useful in studies of allelic and genotypic frequencies in healthy populations from different regions of Brazil, in association studies of infectious or auto-immune diseases, in anthropological studies and in studies on post-transplant evolution. These SNPs can be assessed by different molecular methods. The objective of this study was to improve a simple and fast methodology, PCR-SSP, for the genotyping of three cytokine SNPs using a single laboratorial test. To identify IL2-330T/G and IL2+166G/T, two procedures were used in the same genotyping assay, each one based on the use of 4 primers. To detect TNF-238G/A, two primers were used that amplify guanine and adenine at position -238. This study enabled the improvement of a simple and fast method for identifying three cytokine SNPs in a single test, which can be adopted in any Molecular Biology laboratory as an alternative to the use of expensive kits. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009; 31(4):241-246.

**Key words:** Cytokines; IL2; methodology; single nucleotide polymorphisms; TNF.

**Agradecimentos**

Nós somos gratos aos voluntários que participaram deste estudo e aos pesquisadores que forneceram as amostras de DNA de genotipagens conhecidas: Dra. Valéria Roxo (Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil) e Dr. Dave Turner (Department of Histocompatibility and Immunogenetics, London, England). Este estudo recebeu suporte financeiro da Fundação Araucária do Estado do Paraná e do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

**Referências Bibliográficas**

- Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* 2003;56(7):481-90.
- Stoycheva MV, Murdjeva MA. Cytokines in Salmonella infections. *Folia Med (Plovdiv).* 2004;46(4):5-10.
- Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol.* 2006; 63(5):321-9.
- Mathur A, Baz M, Staples ED, Bonnell M, Speckman JM, Hess PJ Jr, *et al.* Cytokine profile after lung transplantation: correlation with allograft injury. *Ann Thorac Surg.* 2006;81(5):1844-9.
- Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, Vigorito AC, Aranha FJ, de Brito Eid KA, *et al.* Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2003;31(11):1044-50.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(7):3195-9.
- Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997; 24(1):1-8.
- Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation.* 1998;66(8):1014-20.
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1369-76.
- John S, Turner D, Donn R, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, *et al.* Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. *Eur J Immunogenet.* 1998;25(6):419-20.
- Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet.* 1999;26(1):1-3.
- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1992;1(5):353.
- Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, *et al.* Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis.* 2009;13(4):493-8.
- Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL; Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate, Barton A, Worthington J, *et al.* Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet.* 2008;17(22):3532-8.
- Manchanda PK, Mittal RD. Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation. *Mol Cell Biochem.* 2008; 311(1-2):57-65.
- Cho JH, Huh S, Kwon TG, Choi JY, Hur IK, Lee EY, *et al.* Association of C-509T and T869C polymorphisms of transforming growth factor-beta1 gene with chronic allograft nephropathy and graft survival in Korean renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2008;40(7):2355-60.
- Laguila Visentainer JE, Lieber SR, Lopes Persoli LB, Dutra Marques SB, Vigorito AC, Penteado Aranha FJ, *et al.* Relationship between cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. *Cytokine.* 2005;32(3-4):171-7.
- Viel DO, Tsuneto LT, Sossai CR, Lieber SR, Marques SB, Vigorito AC, *et al.* IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol.* 2007;66(6):703-10.
- Tsuneto LT, Visentainer JE, Cavichioli AG, Conçani AP, Silva GC, Sell AM, *et al.* TNF-A (308G/A), IL-6 (1174C/G), IFN-Gamma (874T/A), IL-10 (1082 G/A, 819C/T, 592C/A), and TGF-B1 (+869T/C,+915G/C) genotype frequencies in the Caucoid and Mulatto Brazilian populations. *Tissue Antigens* 2005;66:569-9.
- Visentainer JE, Sell AM, da Silva GC, Cavichioli AD, Franceschi DS, Lieber SR, *et al.* TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet.* 2008;35(4-5):287-93.
- Reynard MP, Turner D, Navarrete CV. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucoid group from the UK. *Eur J Immunogenet.* 2000;27(4):241-9.

22. Cytokine Gene Polymorphism. In: Hansen JA, Dupont B, editor. HLA 2006: Immunobiology of the Human MHC. Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference. Seattle (WA): IHWG Press; 2006.
23. Roxo VMMS. Estudo de associação entre as variantes dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1, TNF, LTA e FAS e o pêfingo foliáceo endêmico [dissertação]. Curitiba: Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, 2003.
24. Fanning GC, Bunce M, Black CM, Welsh KI. Polymerase chain reaction haplotyping using 3' mismatches in the forward and reverse primers: application to the biallelic polymorphisms of tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha. *Tissue Antigens*. 1997;50(1):23-31.
25. Reich K, Mössner R, König IR, Westphal G, Ziegler A, Neumann C. Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *J Invest Dermatol*. 2002;118(1):155-63.
26. Wang L, Chen RF, Liu JW, Yu HR, Kuo HC, Yang KD. Implications of dynamic changes among tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), membrane TNF receptor, and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(2):297-302.
27. Bien E, Balcerska A. Serum soluble interleukin 2 receptor alpha in human cancer of adults and children: a review. *Biomarkers*. 2008;13(1):1-26.
28. Mocellin S, Nitti D. TNF and cancer: the two sides of the coin. *Front Biosci*. 2008;13:2774-83.
29. Ritchie D, Seconi J, Wood C, Walton J, Watt V. Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(9):706-12.
30. Zúñiga J, Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun*. 2001;2(7):363-6.
31. Lu LP, Li XW, Liu Y, Sun GC, Wang XP, Zhu XL, *et al*. Association of -238G/A polymorphism of tumor necrosis factor-alpha gene promoter region with outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *World J Gastroenterol*. 2004;10(12):1810-4.
32. Roxo VM, Pereira NF, Pavoni DP, Lin MT, Hansen JA, de O Poersch C, *et al*. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus -are there any associations? *Tissue Antigens*. 2003;62(5):394-400.
33. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, *et al*. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation*. 2001;72(8):1444-50.
34. Matesanz F, Fedetz M, Leyva L, Delgado C, Fernández O, Alcina A. Effects of the multiple sclerosis associated -330 promoter polymorphism in IL2 allelic expression. *J Neuroimmunol*. 2004;148(1-2):212-7.
35. Saruhan-Direskeneli G, Biçakçigil M, Yılmaz V, Kamali S, Aksu K, Fresko I, *et al*. Rheumatology Education and Research Society Vasculitis Study Group. Interleukin (IL)-12, IL-2, and IL-6 gene polymorphisms in Takayasu's arteritis from Turkey. *Hum Immunol*. 2006;67(9):735-40.
36. MacMillan ML, Radloff GA, Kiffmeyer WR, DeFor TE, Weisdorf DJ, Davies SM. High-producer interleukin-2 genotype increases risk for acute graft-versus-host disease after unrelated donor bone marrow transplantation. *Transplantation*. 2003;76(12):1758-62.

Suporte Financeiro: Fundação Araucária do Estado do Paraná

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Recebido: 20/10/2008

Aceito após modificações: 08/04/2009