

## Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e asma: metanálise é a saída?

### *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and Asthma: Is Meta-analysis the only way out?*

Isabel Ruguê Genov<sup>1</sup>, Dirceu Solé<sup>2</sup>

#### Resumo

O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) tem sido observado de perto nos últimos quinze anos e o emprego de ferramentas de biologia molecular tornou possível a descrição dos vários polimorfismos presentes em seu promotor. Acredita-se que a presença destes polimorfismos possa desempenhar papel crucial na regulação das funções do gene, propiciando em algumas situações a produção diferencial da citocina que por sua vez desempenha papéis centrais nos mecanismos inflamatórios, base do processo patológico que leva à asma. Nesta revisão procuramos explicar os critérios mais recentes adotados na realização de metanálise dos estudos de associação molecular, sem perder de vista a limitação deste método matemático quando aplicado à epidemiologia molecular.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2007; 30(1):2-8 TNF  $\alpha$ , asma, metanálise, genética

#### Abstract

Tumor Necrosis Factor has been largely explored in the last fifteen years and the use of new approaches in molecular biology turned it possible to identify several polymorphisms in the promoter region of its gene. It is believed that the presence of polymorphisms leads to gene's differential function and regulation of cytokine's production, which plays a pivotal part on inflammatory mechanisms and hence also on asthma pathological processes. In this review it is explored the topics behind the execution of a meta-analysis on association studies, nevertheless bearing in mind the limitations of this mathematical method once applied to molecular epidemiology.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2007; 30(1):2-8 TNF  $\alpha$ , asthma, meta-analysis, genetics

1. Mestre em Pediatria, Doutoranda
  2. Professor Titular e Livre Docente
- Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia, Departamento de Pediatria, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM)

Artigo submetido em 16.12.2006, aceito em 14.01.2007.

#### Introdução

O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina usualmente presente na resposta imunológica mediada por células, assim descrita com base em estudos realizados em camundongos<sup>1</sup>. Estudos imunológicos desenvolvidos em modelos murinos podem ser limitados por diferenças entre as espécies e desta forma não refletirem o verdadeiro ambiente imunológico apresentado por algumas doenças do homem.

A asma é uma doença em que linfócitos T têm papel importante, sobretudo os T-helper tipo 2 (Th2) com perfil particular de liberação de citocinas, que inclui frequentemente IL-4, IL-5 e IL-13<sup>2</sup>. Com o aumento de evidências apontando para a presença de outros tipos de citocinas neste mecanismo, fica claro que no homem e, particularmente na asma, alguns mediadores se somarão, incluindo alguns pertencentes ao perfil Th1<sup>1</sup>.

Um destes mediadores é o TNF- $\alpha$ , que se mostrou associado ao processo de inflamação da asma em estudos conduzidos *in vitro*, *ex-vivo*, genéticos e celulares.

O TNF- $\alpha$  é reconhecido como um mediador importante em muitos eventos inflamatórios dependentes de citocinas. Sabe-se que o TNF- $\alpha$  é liberado na resposta alérgica por mastócitos e por macrófagos via mecanismos IgE-dependentes<sup>3</sup> e que níveis aumentados desta citocina foram detectados no lavado bronco-alveolar (LBA) de pacientes com asma submetidos a desencadeamento por alérgenos<sup>4</sup>.

O TNF- $\alpha$  inalado aumenta a responsividade brônquica à metacolina em indivíduos normais e pacientes com asma e associa-se à eosinofilia no escarro<sup>5</sup>. Dados adicionais indicam que o TNF- $\alpha$  pode também aumentar a expressão de moléculas de adesão, facilitando a migração de células inflamatórias para as vias aéreas e ativar mecanismos pró-fibróticos na camada subepitelial da mucosa brônquica<sup>6,7</sup>. Esses dados sugerem que o TNF- $\alpha$  desempenha papel no início da inflamação das vias aéreas asmáticas e na hiper-reatividade brônquica.

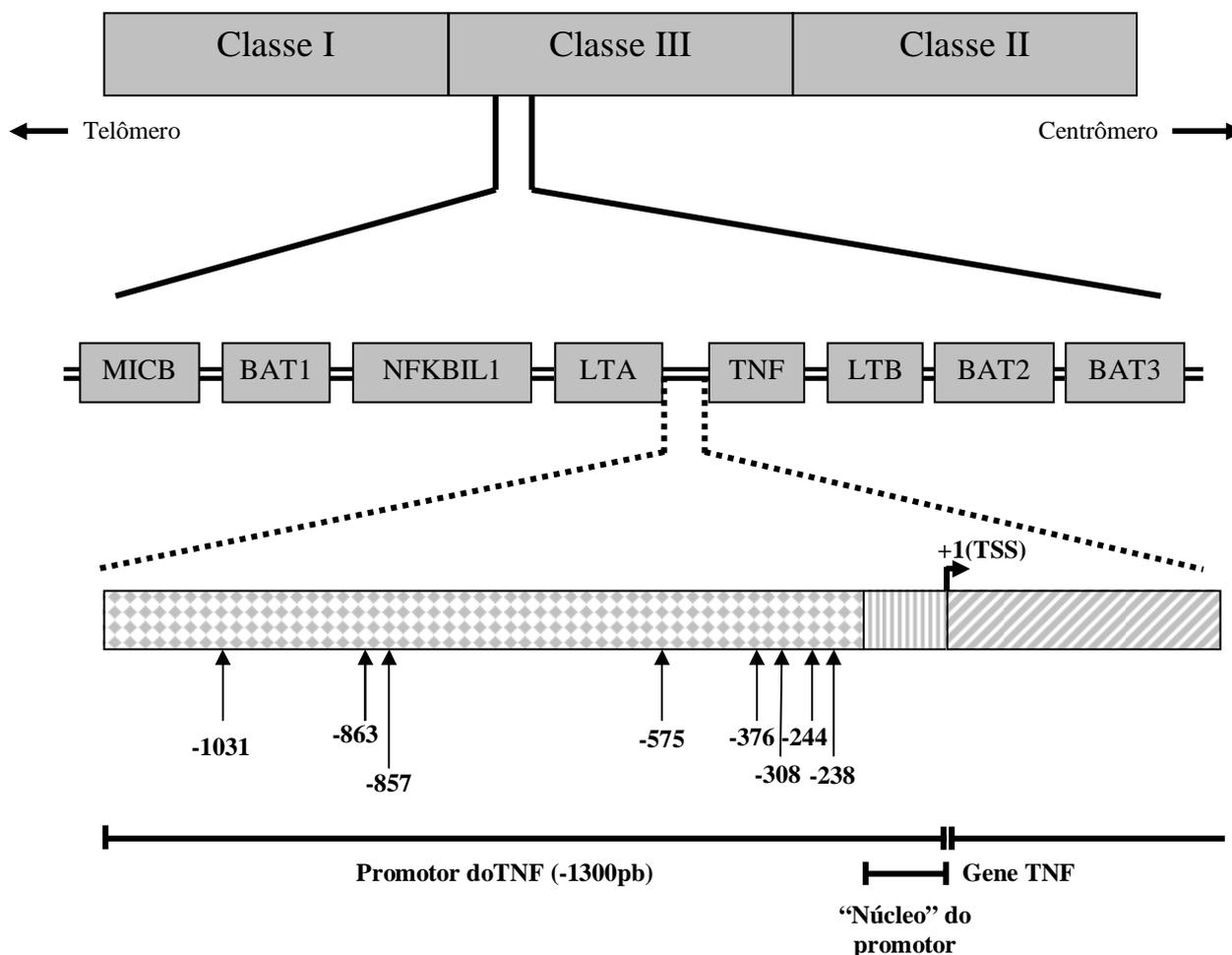
Como exemplo, em estudos mais recentes realizados com o antagonista do TNF- $\alpha$  (etanercept®) no tratamento de asma refratária<sup>8</sup>, observou-se que foi necessário aumento significativo das concentrações de metacolina utilizadas neste grupo de pacientes para deflagrar a queda em 20% do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>). Ainda no mesmo estudo, antes do início do tratamento os monócitos circulantes destes pacientes apresentavam expressão elevada de TNF- $\alpha$  ligado à membrana bem como do receptor 1 de TNF- $\alpha$ . Além disso, aumento dos níveis intracelulares de enzima de conversão de TNF- $\alpha$ , com diferenças significantes quando comparados aos monócitos de indivíduos controle e com asma leve.

No começo da série de estudos em torno do TNF- $\alpha$ , van der Linden *et al*<sup>9</sup> estimularam, *in vitro*, células do sangue total de indivíduos saudáveis com concentrações diferentes de lipopolissacarídeo (LPS) e verificaram que a produção de TNF- $\alpha$  *ex-vivo* se mantinha apesar de diferenças decorrentes de método laboratorial e de variações intra-indivíduo, mostrando que no homem é verdadeira a existência de fenótipos de alta ou baixa produção desta citocina.

Na seqüência, aprofundando os estudos na área da biologia molecular, Louis *et al*<sup>10</sup> conseguiram responder a questão inicialmente formulada por van der Linden quando verificaram que o genótipo GA do polimorfismo de posição -308 do *TNF* (gene do fator de necrose tumoral alfa) estava associado ao fenótipo de alta produção de TNF- $\alpha$ , dando início ao estudo da interferência dos polimorfismos de *TNF* na produção desta citocina. Não por acaso, o *TNF* vem se

mostrando promissor, tanto em modelos de estudos de cossegregação como em estudos caso-controle<sup>11</sup>.

O TNF localiza-se no cromossomo 6p21, em região de classe III do complexo de histocompatibilidade principal humano (HLA), aproximadamente 250 kilobases centromérico ao HLA-B e 850 kilobases telomérico ao HLA-DR (figura 1), região denominada "cluster do gene de *TNF*", entre os genes de linfotóxina alfa (*LTA*) e beta (*LTB*). Até o momento, pelo menos oito variantes foram determinadas no promotor do TNF, nas posições -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -575G/A, -376G/A, -308G/A, -244G/A e -238G/A relativas ao ponto inicial de transcrição<sup>12-18</sup>. A origem desta variação genética ainda é objeto de estudo, e a presença de mutações nas regiões codificadoras do TNF no homem é desconhecida<sup>11</sup>.



**Figura 1** - Esquema da região 6p21.1-6p21.3 com alguns dos genes da região do TNF e os polimorfismos presentes no promotor do TNF. Modificado de Bayley *et al*, 2004.

O estudo intenso dos alelos variantes se deve à possibilidade de condicionamento de mudanças no nível do gene nestes alelos quando comparados ao alelo comum, o que pode afetar a ligação de fatores de transcrição e modificar o controle da atividade do promotor, conseqüentemente, produzindo concentrações finais diferentes de mRNA e proteínas<sup>11</sup>.

O polimorfismo de posição -308, descrito por Wilson *et al*, em que há a troca da base guanina (G, alelo TNF1) por

adenina (A, alelo TNF2)<sup>19</sup>, condiciona um perfil de alta produção de TNF- $\alpha$  apresentado pelos genótipos heterozigotos (TNF1,2) ou homozigotos (TNF2,2) para este alelo, sendo já observado o relato de associação direta dos fenótipos de alta produção e artrite reumatóide<sup>20</sup>, câncer<sup>21,22</sup>, infarto do miocárdio<sup>23</sup> e asma<sup>24-34</sup> e associação indireta com diabetes<sup>35</sup>.

Recentemente, Sharma *et al*<sup>34</sup> avaliaram em primeira instância a atribuição de risco à asma conferida por quatro

polimorfismos de TNF isoladamente, bem como a associação destes com a produção sérica de IgE total e TNF- $\alpha$  em populações asmáticas e controles na Índia. Em uma segunda fase, construíram haplótipos considerando os SNPs -1031C/T, -863C/A, -857T/C, -308G/A do promotor de TNF e *LTA NcoIA/G* e rs3093543A/C localizados na região III do MHC, buscando verificar a existência de haplótipos que confeririam proteção ou susceptibilidade para a manifestação de asma. Neste estudo foi possível determinar que o alelo variante -863A conferia redução de risco para asma, bem como baixa produção sérica tanto de IgE total como de TNF- $\alpha$ . Ainda foi possível identificar, entre seis haplótipos presentes nas populações, um que conferia susceptibilidade à asma e outro que conferia proteção, sendo que no primeiro havia correlação com níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$ , enquanto no segundo houve baixa produção sérica desta citocina. De forma interessante, nos dois haplótipos a posição -308 de TNF era ocupada pela base guanina.

Em populações caucasóides, Wilson *et al*<sup>19</sup> já descreveram que o alelo TNF2 se encontra em desequilíbrio de ligação com o haplótipo *HLA-A1, B8, DR3*.

Assim, da mesma forma que as frequências dos antígenos HLA classe I, como demonstrado por Imanishi *et al*<sup>36</sup>, diferem ao longo das populações brasileiras branca, mulata, negra e índia, o mesmo se estende para os outros antígenos do HLA em outras populações ao redor do mundo. Com isso, o interesse nos genes não-HLA vem aumentando, sobretudo com a determinação de haplótipos envolvendo as regiões de classe I, II e III do MHC<sup>37</sup>.

Será talvez pela diferença étnica das populações que os trabalhos publicados até o momento e que envolvem modelo de estudo caso-controle e a presença de polimorfismo -308G/A de *TNF* e asma atópica<sup>24,28,30-32,34,38-42</sup> não apresentem resultados conclusivos e reprodutíveis?

Talvez essa pergunta permaneça sem resposta tendo-se como base os poucos dados disponíveis até o momento relacionando haplótipos e asma. Por outro lado, considerando os gastos envolvidos por um único laboratório na tipificação de milhares de amostras, a revisão sistemática e metanálise - que compreende a avaliação de toda literatura publicada sobre um assunto de forma conjunta - de estudos de associação mostrou-se como a saída capaz de possibilitar chegar-se a uma conclusão sobre o corpo de evidências.

Assim, a metanálise calcula o tamanho do efeito que cada estudo atribui ao alelo variante ou a grupos de genótipos, a depender do melhor modelo genético (recessivo, dominante, heterozote ou co-dominante), e infere a cada um deles um peso condizente com o tamanho da amostra avaliada.

#### Metanálise de estudos de associação molecular

O uso da revisão sistemática e metanálise nos estudos de associação molecular baseados em população e família como ferramenta de resumo dos dados presentes na literatura médica se faz presente há cerca de uma década<sup>43</sup>. Quando estudos isolados falham em detectar uma associação, quando é desejável explorar as bases de heterogeneidade presentes, ou mesmo para identificação de subgrupos associados com o desfecho de interesse, a metanálise apresenta-se como método ideal. No entanto, apesar desta crescente popularidade, pouca atenção foi dedicada às particularidades metodológicas<sup>43</sup>.

Em adição às considerações tradicionais pertinentes a todas as metanálises, existem questões genéticas relacionadas aos estudos de associação molecular: verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, manipulação de dados de mais de dois grupos ao mesmo tempo em que se evita comparações múltiplas e o agrupamento de dados de forma a fazer sentido aos modelos genéticos<sup>43</sup>. Por isso, a credibilidade dos resultados de revisões sistemáticas e metanálises de estudos de observação depende não ape-

nas da validade dos estudos primários incluídos nas análises, mas também de metodologia rigorosa<sup>44</sup>.

Muitos são os fatores que interferem na boa condução de uma metanálise de estudos de associação molecular, alguns de ordem fundamental, outros mais relacionados aos conceitos de genética clássica e de populações, por isso o esclarecimento destas particularidades uma a uma é essencial.

Levando em consideração que a literatura se encontra repleta de estudos de associação molecular com inclusão de pequeno número de participantes e com achados inconsistentes, principalmente pela falta de padronização quanto à definição de modelo, execução e relato de resultados, é importante que a metanálise não se torne mais um tipo de análise que sofra pela falta de critérios bem estabelecidos<sup>45</sup>.

Assim, aparentemente um tópico de fácil condução, a questão que motiva a metanálise deve ser particularmente clara. Uma questão imprecisa leva a decisões obscuras quanto aos estudos a serem incluídos e como resumir-los<sup>46</sup>.

São componentes principais da questão de pesquisa: características dos participantes que serão incluídos (a etnia da população estudada, o desfecho a ser avaliado), definição das intervenções de interesse (gene de risco e alelo a ser avaliado), definição do desfecho de interesse (contínuo ou dicotômico, especificar a característica da doença sob estudo o máximo possível), definição dos modelos de estudo (caso-controle, cossegregação)<sup>46</sup>.

As metanálises que são realizadas com base em modelos de estudos de associação molecular visam explorar o risco que dado polimorfismo de gene confere a uma doença. Cada estudo incluído em uma metanálise deve passar por seleção rigorosa, em especial no que diz respeito à sua qualidade.

Para avaliar a qualidade e critério utilizado por vários autores de estudos de associação molecular na realização de seus trabalhos, Thakkinian *et al*<sup>47</sup> conceberam uma escala com escores variando de zero a quinze pontos. Embora ela não fosse utilizada para exclusão de estudos, foi validada como ferramenta indicadora de rigor dos autores na condução de seus estudos, pois aborda tanto aspectos de epidemiologia clássica como de epidemiologia molecular.

Uma vez definido o tópico de estudo, o maior número possível de bancos de dados deve ser incluído, de forma a espelhar a totalidade dos estudos conduzidos na área de pesquisa<sup>46</sup>. MEDLINE, EMBASE e LILACS são apenas três dos bancos de dados mais conhecidos.

Fora os bancos de dados, ao longo da pesquisa por estudos, usa-se a busca manual, onde a referência bibliográfica dos primeiros é fonte para levantamento de outras publicações na área.

Há grande dificuldade em se obter estudos não publicados neste campo, já que, de acordo com vários periódicos, um dos critérios adotados para publicação é a significância estatística do resultado obtido pelo estudo<sup>43</sup>. Em estudos de associação molecular, no entanto, esse parâmetro vem sendo considerado mais recentemente, uma vez que o achado estatisticamente significativo é tão importante quanto o não achado, pois vem espelhar em cada raça a importância do polimorfismo sob estudo.

Os descritores, critérios de inclusão e de exclusão de estudos são tópicos que merecem detalhamento para que a metanálise seja passível de reprodução<sup>46</sup>. É desejável que no método de uma revisão sistemática constem os descritores utilizados para busca.

#### Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

A forma mais comum de verificar o EHW é pela melhor estimativa (*goodness-of-fit*) obtida pelo teste de  $\chi^2$  (Qui-quadrado). O teste de  $\chi^2$  para EHW tem  $k(k-1)/2$  graus de liberdade, onde  $k$  equivale ao número de alelos do locus

sob estudo, havendo a possibilidade de definição dos graus de liberdade ainda segundo ( $g - k$ ),  $g$  representando o número de genótipos possíveis<sup>48</sup>.

Uma vez que não seja verificado o estado de EHW, algumas perguntas devem ser respondidas: esta observação se deve a erros de genotipificação, ao acaso, a falha nas conclusões baseadas no EHW ou, ainda, ao efeito do próprio modelo de doença genética<sup>48</sup>? Pode-se ainda inferir que o afastamento do EHW espelha a presença de viés na seleção de indivíduos do grupo controle ou ainda a existência de estratificação populacional<sup>43</sup>.

Na prática, o teste do EHW é comumente usado como controle de qualidade de genotipagens em larga escala e é um dos poucos meios de se identificar erros sistemáticos de genotipagens em indivíduos não relacionados<sup>49</sup>.

Alguns estudos de associação não consideram o desvio do EHW no grupo de pacientes como indício de erro de genotipagem, mas sim assumem uma explicação biológica para esta observação. De forma geral, em estudos de associação apenas o grupo controle ou amostras aleatórias devem se encontrar em EHW<sup>50,51</sup>, sendo praxe este tipo de verificação.

Uma vez identificados estudos em que não se observa o EHW, conduz-se a análise de sensibilidade, que consiste na execução de metanálise omitindo e incorporando os estudos que se desviam do EHW, para avaliar a consistência dos resultados. Apesar de não haver consenso, alguns autores preferem excluir de suas análises os estudos que não se encontram em EHW<sup>43</sup>.

## Heterogeneidade

A revisão sistemática de estudos que investigam uma questão comum, inevitavelmente estará sujeita a elementos de diversidade. Diferenças no modelo de estudo, na condução destes, nos participantes, nas intervenções, na exposição de fatores de risco ou mesmo no desfecho são de forma geral denominados como heterogeneidade clínica ou metodológica<sup>52</sup>.

Em parte, algumas destas diferenças podem ser eliminadas pela definição estruturada da questão em metanálise, mas quando nos referimos aos estudos de associação molecular, fatalmente estaremos nos deparando com diferenças de fundo étnico<sup>53</sup>.

Heterogeneidade estatística é a variação existente nos resultados de efeito sob estudo (diferentes tratamentos, risco atribuído a um gene) entre os diferentes estudos incluídos na metanálise, sendo consequência da diversidade clínica ou metodológica interestudos. Quando investigamos a presença de heterogeneidade, procuramos responder quão diferentes são os resultados dos estudos incluídos na metanálise<sup>43</sup>.

A interferência da heterogeneidade estatística se observa quando o resultado interestudado é maior do que se poderia esperar ao acaso<sup>52</sup>. A presença de heterogeneidade não invalida a metanálise, mas deve ser quantificada de forma a direcionar a melhor forma de avaliação do corpo de resultados<sup>54,55</sup> e igualmente espelhar a consistência dos resultados de uma metanálise<sup>54</sup>. "Heterogeneidade estatística" é tratada apenas por "heterogeneidade" nos estudos que avaliam sua interferência nos resultados da metanálise<sup>53</sup>, sendo aqui adotada a mesma referência.

Existem pelo menos três formas de avaliar a existência de heterogeneidade: estatística Q (ou teste  $\chi^2$  de Cochran), estatística H e estatística  $I^2$ <sup>53</sup>. A necessidade de aplicação de três formas de estatística diferentes se deve a particularidades destas análises individualmente.

A estatística Q indica a presença de heterogeneidade na metanálise, mas tem pouco poder quando o número de estudos incluídos é inferior a oito. Por essa razão, o valor de  $p$  considerado significativo é inferior a 0,10<sup>43</sup>. Esta avaliação é automaticamente gerada pelo programa Review Manager 4.2, bem como a sua melhor estimativa ( $p$ ), consi-

derando a distribuição  $\chi^2$  com  $k-1$  graus de liberdade, onde  $k$  representa o número de estudos incluídos na avaliação.

Por outro lado, da mesma forma que a avaliação da presença de heterogeneidade parece ser de pouca valia quando lidamos com estudos de associação molecular, pois em grande parte das vezes encontra-se presente, a estatística  $I^2$  indica quanto a heterogeneidade afeta as conclusões da metanálise. Valores acima de 75% indicam que a variabilidade dos estudos se deve fortemente à heterogeneidade interestudos do que ao acaso<sup>56</sup>.

A estatística H descreve o valor de Q sobre seus graus de liberdade, sendo que valores superiores a 1,2 indicam presença de heterogeneidade. Sofre interferência quanto ao número de estudos incluídos na medida em que é dependente do valor de Q e, para números menores do que oito estudos, apresenta dificuldade na distinção entre heterogeneidade moderada e achados ao acaso. Também é uma forma de avaliar a extensão de heterogeneidade na metanálise, porém acompanha proporcionalmente o comprometimento da precisão nos estudos<sup>52</sup>.

Quando se assume a inexistência de heterogeneidade, indica-se o uso de modelo de efeito fixo para avaliação do conjunto de estudos incluídos na metanálise; caso contrário, o modelo de efeito randômico é utilizado. Este é mais conservador no cálculo final do efeito (OR ou RR) da metanálise e geralmente apresenta intervalos de confiança mais amplos<sup>43</sup>.

Porém alguns autores defendem que a origem desta heterogeneidade deva ser explorada. Portanto, indica-se a análise de sensibilidade, que consiste na avaliação dos resultados da metanálise do grupo com a inclusão e exclusão daqueles que potencialmente são a razão de heterogeneidade<sup>43</sup>.

Levando em consideração que muitos estudos bem conduzidos muitas vezes demoram mais tempo para serem publicados ou simplesmente permanecem não publicados devido ao uso do valor de  $p$  como critério de aceitação pelos revisores de revistas científicas<sup>45</sup>, atualmente existe uma verdadeira busca dos estudos de achados negativos no que diz respeito aos estudos de associação molecular.

Assim, o gráfico em funil foi introduzido por Light e Pillemer<sup>57</sup> como forma de avaliação do viés de publicação. Em sua forma original, compara o efeito estudado (abscissa) contra o tamanho da população sob estudo que é representado pelo erro padrão ou variância (ordenada). Com isso, quanto maior o número de pacientes incluídos, menor será o erro padrão ou variância, evidenciando no vértice do funil os trabalhos cujo número de indivíduos estudados é maior e em sua base os que têm poucos pacientes<sup>46</sup>.

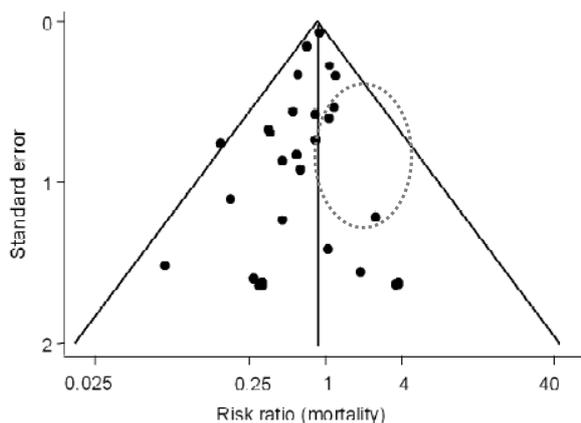
O efeito (abscissa) é representado na forma de razão de chances (OR) ou risco relativo (RR). Quando se obtém a imagem de um mesmo número de trabalhos à esquerda e à direita do valor de efeito nulo (um), diz-se que o viés de publicação é inexistente, sendo este conjunto de estudos selecionados para metanálise denominado "bem-comportado"<sup>46</sup> (figura 2).

Um recurso possível com a aplicação do erro padrão na ordenada é o desenho de linhas retas que formam um triângulo dentro do qual se incluiriam 95% dos pontos (estudos) quando da inexistência de heterogeneidade e viés de publicação<sup>46</sup>.

O uso do gráfico em funil é indicado quando o número de estudos incluídos na metanálise é superior a dez<sup>46</sup>.

## Escolha de um modelo genético

Um dos desafios da análise de estudos de associação molecular se encontra na forma como deveremos reunir os dados. A adoção de modelo dominante, recessivo, co-dominante ou de heteroze dependerá da prevalência de cada genótipo na população sob estudo, como já descrito matematicamente por Thakkinian *et al*<sup>55</sup>.



**Figura 2 - Gráfico em funil hipotético:** a distribuição assimétrica dos estudos indica a presença de viés de publicação às custas de ausência de estudos com grande número de indivíduos (elipse pontilhada) e que estariam indicando maior risco para mortalidade do fator sob estudo. (Fonte: *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions 2005*)

**Tabela 1 -** Comparações múltiplas do efeito do genótipo e possíveis formas de herança.

Modo de herança	AA versus aa (OR <sub>1</sub> )	Aa versus aa (OR <sub>2</sub> )	AA versus Aa (OR <sub>3</sub> )
Recessivo	+	-	+
Dominante	+	+	-
Heteroze	-	+	+
Co-dominante	++	+	+

+ = resultados significantes, ++ = tamanho de efeito equivale ao dobro de +, - = ausência de resultados significantes<sup>(55)</sup>.

Desta tabela advém que:

- Se há igualdade entre OR<sub>1</sub> e OR<sub>3</sub>, ambos diferindo de um e OR<sub>2</sub> é igual a um, sugere-se agrupamento segundo modelo recessivo;
- Se há igualdade entre OR<sub>1</sub> e OR<sub>2</sub>, ambos diferindo de um e OR<sub>3</sub> é igual a um, sugere-se agrupamento segundo modelo dominante;
- Se OR<sub>2</sub> e OR<sub>3</sub> são diferentes de um e OR<sub>1</sub> é igual a um, sugere-se agrupamento segundo modelo de heteroze;
- Se OR<sub>1</sub> é maior que OR<sub>2</sub>, com OR<sub>2</sub> maior que um e OR<sub>1</sub> é maior que OR<sub>3</sub>, com OR<sub>3</sub> maior que um; da mesma forma, se OR<sub>1</sub> é menor que OR<sub>2</sub>, com OR<sub>2</sub> menor que um e OR<sub>1</sub> menor que OR<sub>3</sub>, com OR<sub>3</sub> menor que um sugere-se modelo co-dominante.

Na construção deste modelo, o alelo A é o que se suspeita atribuir suscetibilidade à doença ou responsável pelo aumento de risco da mesma. Portanto, quando se assume o **modelo dominante**, pacientes com genótipo AA e Aa são somados e comparados contra o grupo aa; no **modelo recessivo** soma-se o grupo aa ao Aa e compara-se contra o grupo AA; no **modelo de heteroze** os grupos AA e aa são somados e comparados contra o grupo Aa e, por fim, no **modelo co-dominante** cada um dos grupos é comparado de forma independente.

Uma das grandes vantagens desta avaliação é que ela permite que os dados guiem a melhor escolha de um modelo genético. Em muitas metanálises a escolha do modelo genético não é bem justificada e a não ser que existam fortes indicações teóricas e biológicas para o uso de um determinado modelo, é sugerido que esta abordagem seja feita<sup>55</sup>.

Desta forma, nas metanálises cujo desfecho é dicotômico (presença/ ausência do alelo variante), a escolha do melhor modelo genético pode ser feita não baseada apenas nas observações biológicas obtidas com a realização de estudos celulares ou moleculares, mas também confirmadas por este método matemático.

Diferentemente da metanálise convencional, que apresenta dois grupos de interesse sob estudo, na metanálise de estudos de associação temos três genótipos de interesse envolvidos no desfecho: dois homocigotos e um heterocigoto (classicamente descritos por AA, Aa, e aa).

Na descrição de escolha do melhor modelo feita por Thakkinian *et al*<sup>55</sup>, é importante lembrar que dominante, co-dominante, recessivo e heteroze são características atribuídas classicamente em genética ao fenótipo apresentado, não ao genótipo. No entanto, a relação entre genótipo e fenótipo se estreitará à medida que podemos, através do modelo matemático, determinar se e como estes grupos deverão fundir-se para análise.

O passo inicial consiste na comparação dos três genótipos entre si para explorar a possível forma de herança, como é demonstrado na tabela 1:

Alguns estudos apontam maior suscetibilidade à asma nos pacientes que apresentam o alelo TNF2<sup>26-28,31,34</sup>, enquanto outros indicam que o alelo TNF1 desempenha este papel<sup>25,32</sup>. Ainda há estudos que não encontraram associação do alelo TNF2 e suscetibilidade à asma<sup>28,34,38,40,42</sup>. Como a asma é uma doença complexa, que conta com a participação de vários genes para apresentação de seu fenótipo final, investigar a contribuição isolada de um gene demanda número elevado de pacientes, em especial se a frequência do mesmo é pequena na população sob estudo.

Assim, a elaboração de uma metanálise que busque a inclusão de trabalhos com método semelhante é desejável, uma vez que será possível agrupar maior número de pacientes estudados e conferir maior poder estatístico para responder questões de estudos de associação molecular<sup>45</sup>.

Por outro lado, embora os estudos de larga escala baseados em população sejam reconhecidamente os melhores para definir a presença de associação gene-doença, seus resultados dependem da realização conjunta e esforço somado de vários laboratórios e, conseqüentemente podem estar à disposição na dependência do custo arcado por cada centro de pesquisa<sup>58</sup>.

Recentemente foram publicadas duas metanálises avaliando o papel do polimorfismo TNF -308G/A e asma<sup>59,60</sup>. A despeito de diferenças observadas quanto aos critérios de inclusão de trabalhos, quanto ao modelo de efeito selecionado (fixo ou randômico), à realização do teste de sensibilidade e mesmo a achados não significantes da associação em populações isoladas, ao fim ambos concordam quanto à relevância do papel do alelo TNF2 e suscetibilidade à asma.

Com a redescoberta do método de metanálise para estudos de associação molecular observado nos últimos dez

anos<sup>55</sup>, não podemos deixar de levantar as limitações deste.

No mundo em que cada vez mais notamos o desenvolvimento e emprego de ferramentas da bio-informática para análise conjunta não só de polimorfismos localizados no promotor de um único gene como também da análise da presença de epistasia de polimorfismos em genes distintos, sem falar da existência de plataformas de *microarray* que possibilitam a análise conjunta de milhares de genes, a metanálise deixa de ocupar uma posição central como é observado na prática clínica para ocupar a posição de utilidade limitada na medida em que possibilita a visualização estreita da relação de risco de um polimorfismo e uma doença, podendo assim ser uma ferramenta a nortear pesquisas de campo de maior envergadura quando estudos menores se mostram inconclusivos<sup>45</sup>.

## Referências

1. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol* 2001;79: 132-40.
2. Beisswenger C, Kandler K, Hess C, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, et al. Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. *J Immunol* 2006;177: 1833-7.
3. Ohkawara Y, Yamauchi K, Tanno Y, Tamura G, Ohtani H, Nagura H, et al. Human lung mast cells and pulmonary macrophages produce tumor necrosis factor-alpha in sensitized lung tissue after IgE receptor triggering. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7: 385-92.
4. Cembrzynska-Nowak M, Szklarz E, Ingłot AD, Teodorczyk-Injeyan JA. Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;147: 291-5 apud Russo C, Polosa R. *Clin Sci* 2005;109: 135-42.
5. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152: 76-80.
6. Lassalle P, Gosset P, Delneste Y, Tscopoulos A, Capron A, Joseph M, et al. Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells during the late asthmatic reaction: role of macrophage-derived tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol* 1993;94: 105-10.
7. Yamamoto H, Sedgwick JB, Busse WW. Differential regulation of eosinophil adhesion and transmigration by pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1998;161: 971-7.
8. Berry MA, Hargadon B, Shelley M, Parker D, Shaw DE, Green RH, et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med* 2006;16:697-708.
9. van der Linden MW, Huizinga TW, Stoeken DJ, Sturk A, Westendorp RG. Determination of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation. *J Immunol Methods* 1998;218: 63-71.
10. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaaf-Lafontaine N, Roland S, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998;113: 401-6.
11. Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 2004; 5:315-29.
12. D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994;39: 150-4.
13. Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998;51: 605-12.
14. Ugliandolo AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, et al. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Tissue Antigens* 1998;52: 359-67.
15. Brinkman BM, Giphart MJ, Verhoef A, Kaijzel EL, Naipal AM, Daha MR, et al. Tumor necrosis factor alpha-308 gene variants in relation to major histocompatibility complex alleles and Felty's syndrome. *Hum Immunol* 1994;41: 259-66.
16. Brinkman BM, Kaijzel EL, Huizinga TW, Giphart MJ, Breedveld FC, Verweij CL. Detection of a C-insertion polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha (TNFA) gene. *Hum Genet* 1995;96: 493.
17. 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: 353.
18. Hamann A, Mantzoros C, Vidal-Puig A, Flier JS. Genetic variability in the TNF-alpha promoter is not associated with type II diabetes mellitus (NIDDM). *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211: 833-9.
19. Wilson AG, Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LBA, Duff GW. An allelic polymorphism within the Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993;177: 557-560.
20. Khanna D, Wu H, Park G, Gersuk V, Gold RH, Nepom GT, et al. Association of tumor necrosis factor alpha polymorphism, but not the shared epitope, with increased radiographic progression in a seropositive rheumatoid arthritis inception cohort. *Arthritis Rheum* 2006;54: 1105-16.
21. Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT, et al. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol* 2006;7: 27-38.
22. Shih CM, Lee YL, Chiou HL, Chen W, Chang GC, Chou MC, et al. Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006;52: 15-20.
23. Bennet AM, van Maarle MC, Hallqvist J, Morgenstern R, Frostegard J, Wiman B et al. Association of TNF-alpha serum levels and TNFA promoter polymorphisms with risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2006;187: 408-14.
24. Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 551-4.
25. Albuquerque RV, Hayden CM, Palmer LJ, Laing IA, Rye PJ, Gibson NA, et al. Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28: 578-84.
26. Chagani T, Pare PD, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Behbehani NA, et al. Prevalence of tumor necrosis factor-alpha and angiotensin converting enzyme polymorphisms in mild/moderate and fatal/near-fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160: 278-82.
27. Li Kam Wa TC, Mansur AH, Britton J, Williams G, Pavord I, Richards K, et al. Association between -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism and bronchial hyperreactivity in asthma. *Clin Exp Allergy* 1999;29: 1204-8.
28. Winchester EC, Millwood IY, Rand L, Penny MA, Kessling AM. Association of the TNF-alpha-308 (G-->A) polymorphism with self-reported history of childhood asthma. *Hum Genet* 2000; 07: 591-6.
29. Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM. Relation between tumor necrosis factor polymorphism TNF $\alpha$  -308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 82-85.
30. Di Somma C, Charron D, Deichmann K, Buono C, Ruffilli A. Atopic asthma and TNF-308 alleles: linkage disequilibrium and association analyses. *Hum Immunol* 2003; 64: 359-65.
31. Sandford AJ, Chan HW, Wong GW, Lai CK, Chan-Yeung M. Candidate genetic polymorphisms for asthma in Chinese schoolchildren from Hong Kong. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8: 519-27.
32. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Wang HJ, Kim YJ, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 397-403.
33. Wang TN, Chen WY, Wang TH, Chen CJ, Huang LY, Ko YC. Gene-gene synergistic effect on atopic asthma: tumour necrosis factor-alpha-308 and lymphotoxin-alpha-NcoI in Taiwan's children. *Clin Exp Allergy* 2004;34: 184-8.
34. Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma SK, Ghosh B. Association of TNF Haplotypes with Asthma, Serum IgE levels and Correlation with Serum TNF-{alpha} levels. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; [Epub ahead of print].
35. Shiao MY, Wu CY, Huang CN, Hu SW, Lin SJ, Chang YH. TNF-alpha polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients. *Tissue Antigens* 2003;61: 393-7.
36. Imanishi T, Akasa T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. IN: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Eds) *Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference, 1991, Oxford University Press, Yokohama, 1992, 1065-1220.*
37. Dorak MT, Shao W, Machulla HK, Lobashevsky ES, Tang J, Park MH, et al. Conserved extended haplotypes of the major

- histocompatibility complex: further characterization. *Genes Immun* 2006;22: 1-18.
38. Louis R, Leyder E, Malaise M, Bartsch P, Louis E. Lack of association between adult asthma and the tumour necrosis factor alpha-308 polymorphism gene. *Eur Respir J* 2000;16: 604-8.
  39. Zhu S, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, et al. Polymorphisms of IL-4, TNF- $\alpha$  and Fc $\epsilon$ RI $\beta$  genes and the risk of allergic disorders in at-risk infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1655-1659.
  40. Buckova D, Holla LI, Vasku A, Znojil V, Vacha J. Lack of association between atopic asthma and the tumor necrosis factor alpha -308 gene polymorphism in a Czech population. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2002;12: 192-7.
  41. Bilolikar H, Nam AR, Rosenthal M, Davies JC, Henderson DC, Balfour-Lynn IM. Tumour necrosis factor gene polymorphisms and childhood wheezing. *Eur Respir J* 2005;26: 637-46.
  42. Randolph AG, Lange C, Silverman EK, Lazarus R, Weiss ST. Extended haplotype in the tumor necrosis factor gene cluster is associated with asthma and asthma-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 15;172: 687-92. Epub 2005 Jun 23
  43. Attia J, Thakkinstian A, D'Este C. Meta-analyses of molecular association studies: Methodologic lessons for genetic epidemiology. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 297-303.
  44. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. *JAMA* 2000;283: 2008-2011.
  45. Munafò MR, Flint J. Meta-analysis of genetic association studies. *Trends Genet* 2004; 20: 439-44.
  46. Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews and Interventions* 4.2.5. versão de maio de 2005 [online]. Disponível em: URL: <http://www.cochrane.org/resources/handbook/hbook.htm>
  47. Thakkinstian A, McEvoy M, Minelli C, Gibson P, Hancox B, Duffy D et al. Human Genome Epidemiology (HuGE) Review: Systematic Review and Meta-analysis of the association between  $\beta_2$ -adrenoceptor polymorphisms and Asthma: a HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2005;162: 201-211.
  48. Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational Inferences about departures from Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005;76: 967-986.
  49. Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A et al. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet* 2004;12: 395-399.
  50. Leveque C, Elbaz A, Clavel J, Richard F, Vidal J, Amouyel P et al. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNos and iNos genes in a community-based case-control study. *Hum Mol Genet* 2003;12: 79-86.
  51. Nejentsev S, Laaksonen M, Tienari PJ, Fernandez O, Cordell H, Ruutiainen J et al. Intercellular adhesion molecule-1 K496E polymorphisms: study of association with multiple sclerosis. *Hum Immunol* 2003;64: 345-349.
  52. Higgins JPT, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statist Med* 2002;21: 1539-1558.
  53. Thomas DC, Witte JS. Point: Population Stratification: A problem for case-control studies of candidate-gene associations? *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2002;11: 505-512.
  54. Higgins JPT, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *Brit Med J* 2003; 327:557-560.
  55. Thakkinstian A, McElduff P, D'Este C, Duffy D, Attia J. A method for meta-analysis of molecular association studies. *Stat Med* 2005; 24:1291-306.
  56. Trikalinos TA, Salanti G, Houry MJ, Ioannidis PA. Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg Equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am J Epidemiol* 2006; 163: 300-309.
  57. Light RJ, Pillemer DB. Summing Up: The science of reviewing research. In: Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews and Interventions* 4.2.5. Capítulo 8. versão de maio de 2005 [online].
  58. Minelli C, Thompson JR, Abrams KR, Thakkinstian A, Attia J. The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies. *Int J Epidemiol* 2005;34: 1319-1328.
  59. Gao J, Shan G, Sun B, Thompson PJ, Gao X. Association between polymorphism of tumor necrosis factor  $\alpha$  -308 gene promoter and asthma: a meta-analysis. *Thorax* 2006; 61: 466-471.
  60. Aoki T, Hirota T, Tamari M, Ichikawa K, Takeda K, Arinami T et al. An association between asthma and TNF -308G/A polymorphism: meta-analysis. *J Hum Genet* 2006; 51: 677-685.

## Correspondência:

Isabel Ruguê Genov

Av. Santa Inês, 881 apto. 173A - Mandaqui

02415-001 - São Paulo - SP - Brasi