

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/017/2008

FREQÜÊNCIA DO POLIMORFISMO DE GENE DA *IL-10*
EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO NA AMAZÔNIA

Bolsista: Carlos Alberto Morais Menezes Júnior, FAPEAM

Orientadora: Luiz Fernando de Souza Passos (UFAM)

MANAUS

2009

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Título: “Frequência do polimorfismo de gene da *IL-10* em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico na Amazônia”.

Nº do projeto: PIB-S/017/2008

Renovação: Não

Orientador: Luiz Fernando de Souza Passos

Bolsista: Carlos Alberto Morais Menezes Júnior, FAPEAM

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Passos

Bolsista: Carlos Alberto Morais Menezes Júnior, FAPEAM

RESUMO

O LES possui uma patogênese multifatorial com uma múltipla suscetibilidade genética e fatores ambientais envolvidos na sua iniciação. Dentre as relações multifatoriais, podemos destacar diversas vias como: hiperatividade de linfócitos B; dificuldade na circulação e remoção de complexos antígeno-anticorpo e a alteração no perfil de diversas citocinas, contribuindo dessa forma para um ambiente pró-inflamatório em tecidos-alvo. Estudos mostraram que a produção espontânea de IL-10 pelas células B e de monócitos do sangue periférico de lúpicos é significativamente mais alta do que aquele de controles. O DNA extraído será amplificado e submetido a ensaio com enzima de restrição *Mnl* I a 37°C “overnight” obtendo-se amplicon de 285p, eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo e visualização em transiluminador de luz ultra-violeta. Em nosso estudo, a frequência do alelo G não foi tão baixa como para os coreanos, mas também não tão alta como para os hispano-americanos, africanos e relativamente para os europeus. Encontramos uma frequência intermediária entre tais valores, 37,6% para o grupo de pacientes. Os genótipos GA e AA para o grupo de lúpicos esteve bem pareado, com o genótipo GA obtendo 42% e o AA 41% da frequência. Coube ao genótipo GG a menor frequência. Dessa forma, a proporção da distribuição das frequências manteve a de alguns trabalhos, distanciando-se dos coreanos pela elevada frequência observada no genótipo AA.

Palavras-chave: Lúpus. Genética. Polimorfismo. IL-10. Frequência. Amazonas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Polimorfismos do gene IL-10 encontrados nos pacientes com LES.....24

Tabela 2 – Frequências alélica, genotípica e de carreadores do alelo A e G do polimorfismo da posição 1082 do gene IL-10 em indivíduos casos e controles.....24

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 – Comparação dos polimorfismos do gene da IL-10 entre pacientes e controles.....	25
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Diferentes caminhos que contêm estabelecidos lócus suscetíveis no LES.....12
- Figura 2** – Mapa da IL-10 no cromossomo 1q31-q3214
- Figura 3** – Gel de agarose a 1,5% com a utilização dos primeiros primers.....21
- Figura 4** – Continuação do gel anterior, evidenciando o controle negativo – branco.22
- Figura 5** – Gel de agarose a 3% com o produto da digestão pela enzima *Mnl* 1 do segmento de DNA amplificado do gene IL-10.....23

LISTA DE SIGLAS

CTAB – Brometo de Hexadeciltrimetilamônio ou Cetramina
CRP - C-reactive protein, pentraxin-related
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DTAB - Brometo de dodeciltrimetilamônio
EDTA – “Ethylenediamine tetraacetic acid”
EBV – Vírus Epstein Barr
HLA – Antígeno Leucocitário Humano
IFN – Interferon
IL – Interleucina
IRAK1 - interleukin 1 receptor-associated kinase 1
IRF5 - interferon regulatory factor 5
ITGAM – integrin alpha M;
LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico
MHC – “Major Histocompatibility Complex”
PDCD1 - “Programmed Cell Death-1”
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
PTPN22 - protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RNA – Ácido Ribonucléico
RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro
RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”
TREX1 - three prime repair exonuclease 1
SNP - “Single Nucleotide Polymorphism”
TNFAIP3 – “tumour necrosis factor- α induced protein 3;”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico: Auto-imunidade	10
2.2 Lúpus Eritematoso Sistêmico: Estudos de associação pan-genômicos	11
2.3 Interleucina 10	14
2.4 Interleucina 10 x LES	15
3. JUSTIFICATIVA	16
4. OBJETIVO	18
4.1 Geral:	18
4.2 Específicos:	18
5. METODOLOGIA	19
5.1 Material e métodos	20
5.2 Ensaio de amplificação de DNA para o gene da IL-10 na posição 1082	20
5.3 Análise Estatística	20
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO	27
9. REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica que atinge vários órgãos do corpo humano. É uma doença multissistêmica e os pacientes podem apresentar-se sob diversas maneiras diferentes. A heterogeneidade clínica desta doença reside sobre sua complexa etiopatogênese, provavelmente envolvendo relações multifatoriais entre elementos genéticos e a suscetibilidade individual a fatores ambientais (MANSON & RAHMAN, 2006).

O LES é uma doença relativamente comum, com uma prevalência que pode atingir 1 para cada 2000 indivíduos. Atinge mais mulheres na faixa reprodutora com uma proporção entre os sexos feminino e masculino de 10:1. A concordância em gêmeos idênticos é 30% e em gêmeos dizigóticos é 5%. Isto sugere que os fatores genéticos desempenham um papel importante na predisposição da doença, mas que fatores ambientais também são relevantes destacando-se a exposição à luz solar, drogas e infecções, especialmente com o vírus Epstein-Barr (MOK & LAU, 2003; PISETSKY, 2007).

Diversas são vias que podem culminar e contribuir no aparecimento da doença. E essas vias possuem determinantes genéticos próprios (PASSOS, 2007). As citocinas participam de forma importante uma vez que medeiam as respostas do sistema imune (ABBAS, 2003). Destacaremos dentre as citocinas a IL-10. Esta citocina se encontra elevada em pacientes com LES cabendo ao seu promotor polimorfismos correlacionados com a manifestação clínica da doença (ESKADALE, 1998).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lúpus Eritematosos Sistêmico: Auto-imunidade

O Lúpus Eritematoso Sistêmico é uma doença sistêmica de etiologia autoimune suposta, que é caracterizada pela ativação de células B policlonais (RÖNNELID, 2003). Nesta doença, um aumento na produção de anticorpos, especialmente de auto-anticorpos antinucleares, em conjunto com a deficiente depuração de complexos imunes elevam os níveis desses complexos configurando um ambiente propício para o desencadeamento da resposta inflamatória (RÖNNBLUM, 2003).

O Lúpus também se caracteriza pela baixa tolerância aos auto-antígenos, principalmente aos antígenos nucleares, levando, portanto, à auto-reatividade das células B e T, onde se percebe novamente a formação de auto-anticorpos e o depósito de complexos imunes em diferentes tecidos.

O Lúpus possui uma patogênese multifatorial com uma múltipla suscetibilidade genética e fatores ambientais envolvidos na sua iniciação.

Dentre as relações multifatoriais, podemos destacar diversas vias como: hiperatividade de linfócitos B; disfunção na regulação de linfócitos T; dificuldade na circulação e remoção de complexos antígeno-anticorpo e a alteração no perfil de diversas citocinas, contribuindo dessa forma para um ambiente pró-inflamatório em tecidos-alvo (PASSOS, 2007).

Essas vias estão sob o jugo de diversos genes. Dessa forma, polimorfismos podem alterar a responsividade e contribuir para a manifestação da doença.

Os linfócitos B possuem receptores ligados a membrana que interagem com as moléculas receptoras na superfície do linfócito T auxiliar dando início a seqüência de ativação das células B, culminando no desenvolvimento de células efetoras secretoras de moléculas de anticorpo (ABBAS, 2003).

O linfócito B pode se tornar hiper-reativo quando moléculas estimulatórias, moléculas CD28, e inibitórias, moléculas CTLA-4, são alteradas em sua função (PASSOS, 2007). As infecções podem estimular o desequilíbrio auto-imune e efetivar uma maior exacerbação clínica da doença.

A infecção pelo vírus Epstein-Barr, o agente etiológico da mononucleose infecciosa, inclui um período de latência e um de virulência no qual os vírus podem emergir em quantidade suficiente para causar estimulação imune (KOMINSKY, 2006).

O EBV parece ser capaz de infectar populações de linfócitos B auto-reativos, perpetuando sua presença em tais células, além de causar sua expansão mediante a indução de proliferação e diferenciação celular.

A persistência de linfócitos B infectados pelo EBV poderia decorrer de uma falha no mecanismo de apoptose. O sistema Fas/Fas-Ligante é um mecanismo de controle, ou seja, é capaz de desencadear a apoptose em um linfócito B ativado. Assim, um defeito nesse sistema poderá causar a perpetuação dessas células (KOMINSKY, 2006).

Além do mais, como a apoptose é um mecanismo regulador e programado, a sua desregulação acarretará liberação de altas taxas de materiais nucleares e citoplasmáticos. Dessa forma, esses materiais podem estimular a expansão de células T helper auto-reativas, através de citocinas, ativando as células B (ABBAS, 2003).

2.2 Lúpus eritematoso sistêmico: estudos de associação pan-genômicos

O Lúpus, desde há muito tempo, é reconhecida como uma doença com forte fator de risco genético. A elevada taxa de incidência em mulheres, bem como o aumento do risco de determinados grupos étnicos são sugestivos de um efeito genético. Forte evidência advém dos estudos com gêmeos, onde a taxa de concordância entre homozigotos varia entre 15% e 59% em comparação com apenas 2 a 5% em gêmeos dizigóticos (CERVINO & TSINOREMAS, 2007).

Com o recente lançamento de chips tecnológicos para os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs single nucleotide polymorphisms), é agora possível no genótipo detectar meio milhão de nucleotídeos polimorfismos simples em cada indivíduo, cobrindo assim cerca de 80% do genoma humano. Tais estudos têm sido apenas tecnicamente possível nos últimos anos e os resultados já foram publicados para doenças complexas como câncer de

pulmão, mal de Parkinson, doença inflamatória intestinal e infarto do miocárdio (CERVINO & TSINOREMAS, 2007).

Devido a perda de tolerância imunológica para auto-componentes ser a base etiológica do lúpus, muitos genes que codificam proteínas regulamentares ou com funções adaptativas no sistema imune foram considerados como candidatos (RHODES & VYSE, 2008)

As associações genéticas identificadas até o presente momento indicam que muitos caminhos diferentes, processos e tipos celulares estão envolvidos na geração do fenótipo lúpico. A maioria desses genes estão envolvidos em três tipos de processos biológicos: processamento de complexos imunes, função Toll Like receptor e produção de interferon tipo I, e transdução sinal imune em linfócitos (HARLEY, 2009).

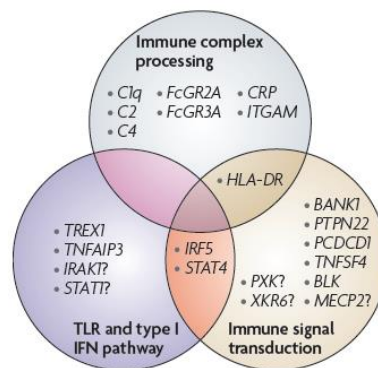


Figura 1 – Caminhos que contêm estabelecidos lócus suscetíveis no LES. BLK, linfóide B tirosino quinase; C1Q, complemento componente 1, subcomponente q; C2, complemento componente 2; CRP, proteína C reativa; FcGR2A, Fc fragmento de IgG, baixa afinidade IIa, receptor CD32; FcGr3A, Fc fragmento de IgG, baixa afinidade IIIa, receptor CD16a; IFN, interferon; IRAK1, receptor associado quinase 1 interleucina 1; IRF5, interferon fator regulatório 5; ITGAM, integrina alfa M; PCDCD1, célula programatária de morte 1; PTPN22, proteína tirosino-fosfatase, não receptor tipo 22; STAT, sinal transdutor e ativador de transcrição; TLR, receptor semelhante a TOLL; entre outros. Retirado de Harley, 2009.

Primeiro, defeitos na depuração de células apoptóticas, processamento e apresentação aos linfócitos têm sido implicados no desenvolvimento do lúpus. Alelos em certos lócus para os quais a associação com lúpus tenham sido identificadas ou confirmadas (como genes HLA-DR, CRP e genes codificantes de fragmentos de receptores Fc) possam afetar a forma em que proteínas codificadas reagem com complexos imunes, proporcionando apoio

molecular à transformação do complexo imune em um tema importante na patogênese do lúpus (HARLEY, 2009).

Esta sugestão é reforçada pelos baixos níveis de proteínas envolvidas na cascata do complemento na circulação sanguínea de lúpicos, e pela associação de lúpicos com a ausência de proteínas do complemento como consequência de alelos homozigóticos (HARLEY, 2009).

ITGAM, também conhecido como CD11b, é o mais novo membro dessa via. Ela codifica a cadeia α da integrina $\alpha M\beta 2$, uma integrina molecular adesiva que vincula não só o complemento clivado de C3b, como uma miríade de outros possíveis ligantes relevantes para o lúpus (HARLEY, 2009).

Segundo, diversos genes recentemente identificados (IRAK1, TREX1, IRF5 e TNFAIP3) codificam componentes acima e abaixo na via de produção do interferon tipo I. Compreender como estes genes estão envolvidos na etiologia do lúpus será vital no entendimento de como o excesso de interferon pode promover a expressão de pró-citocinas e quimiocinas, a maturação de células dendríticas, a ativação da auto-reatividade de células B e T, produção de auto-anticorpos e perda da auto-tolerância (HARLEY, 2009).

Terceiro, transdução em células imunes, especialmente em células B e T, é outro caminho que tem mostrado múltiplos genes suscetíveis. A ativação de células B por antígenos mediados por ligação a receptores de células B (superfície da imunoglobulina G) e posterior interação com clones de células B auto-reativas com células T helper 2 leva à perda da auto-tolerância e da imunidade. Por exemplo, PTPN22 é uma fosfatase seletiva que modula a transdução de sinais em células T, e representa um caso em qual uma variação causal foi identificada como contribuinte na suscetibilidade à doença (HARLEY, 2009).

2.3 IL-10 (Interleucina - 10)

As células T regulatórias servem para limitar as respostas inflamatórias e promover tolerância imune para antígenos específicos. Esta célula apresenta uma proteína de transmembrana chamada CD25. Como outras células T, ela também possui receptor de célula T alfa-beta para antígeno e pode então ser

ativada. Passa, portanto, a expressar citocinas (VAN OOSTERHOUT & BLOKSMA, 2005).

Apresenta subtipos como células T regulatórias naturais e as células T regulatórias adaptativas. Participam de forma importante como células imunoregulatórias, capazes de suprimir respostas imunes adaptativas mediadas vias Th1 e Th2. Dentro das células T regulatórias encontramos a célula tipo 1 (Tr1) que medeia supressão via citocina IL-10, suprimindo a produção de IgE, enquanto aumenta a produção de IgG e IgA pelos linfócitos B. (KARAGIANNIDIS, 2004).

O gene humano da IL-10 está localizado no cromossomo 1 (1q31-1q32) e codifica cinco éxons. A região promotora da IL-10 é extremamente polimórfica contendo, entre outros, dois microsátélites, IL-10R e IL-10G, em 4kb acima do início do local de transcrição, e três polimorfismos de nucleotídeo único: a substituição de um G por A na posição -1082, de C para T na -819 e C para A na posição -592 (ROSADO, 2008).

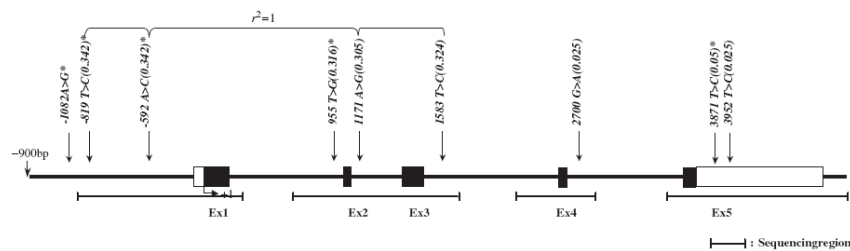


Figura 2 – Mapa da IL-10 no cromossomo 1q31-q32 (5kb) mostrando os SNPs e os éxons. Retirado de Sung et al, 2006.

Como tais microsátélites e polimorfismos de nucleotídeo único estejam na proximidade de supostos fatores transcricionais obrigatórios e de regiões reguladoras, acredita-se que tais alterações afetem, portanto, níveis produtivos de transcrição da IL-10 (ROSADO, 2008)

2.4 IL-10 (Interleucina - 10) x Lúpus Eritematoso Sistêmico

O Lúpus tem sido considerado uma doença com a vertente T helper (Th)₂ baseado na presença de níveis elevados de interleucina (IL)-4, IL-6, e IL-10 e baixos níveis de IL-2, fator de necrose tumoral alfa, fator de crescimento transformante e interferon. No entanto, há provas de que a produção de citocinas varie durante a evolução da doença (GUARNIZO-ZUCCARDI, 2007).

Em modelos murínicos lúpicos, no início da doença ocorre a predominância de citocinas Th₁, enquanto em fases clínicas mais tardias, ocorre um desbalanço a favor de citocinas Th₂ (GUARNIZO-ZUCCARDI, 2007).

Mesmo assim, ocorre uma certa discordância em relação aos autores e estudiosos no tocante a quais citocinas encontram-se ou não elevadas. No entanto, a maioria concorda que pacientes lúpicos possuem níveis elevados de IL-10 e IL-6, duas citocinas que ocupam um importante papel na patogênese do lúpus (GUARNIZO-ZUCCARDI, 2007).

Estudos mostraram que a produção espontânea de IL-10 pelas células B e de monócitos do sangue periférico de pacientes com lúpus é significativamente mais alta do que aquele de controles (LLORENTE & RICHAUD-PATIN 2003). A expressão de IL-10 transcritos é significativamente aumentada na população de célula não-T de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lúpus comparado com controles (CSISZAR et al, 2000). Além disso, as concentrações de IL-10 no soro são mais altas em pacientes com lúpus do que em controles e são correlacionadas com atividade da doença clínica (GRONDAL, 2000).

Estudos genéticos abordando polimorfismos da região promotora de IL-10 podem informar acerca da suscetibilidade ou o risco de determinadas complicações do lúpus (GIBSON, 2001).

Lazarus *et al* encontrou três polimorfismos de base única nas posições -1,082 (G / A), -819 (C / T) e -592 (C / A) do promotor do gene de IL-10. Em outro estudo, Gibson *et al* encontrou significativa associação entre os polimorfismos do gene de IL-10 e a suscetibilidade para o lúpus em afro-americanos (LAZARUS, 1997 & GIBSON, 2001). Essas correlações indicam

que a variação genética do genótipo de IL-10 é crucial tanto para a produção de IL-10 como para o desenvolvimento do lúpus (ESKADALE, 1998).

Alfonso et al verificou que IL-10 com longos alelos (CA repetindo-se \geq 22) estão associados a alta produção de IL-10 e com a suscetibilidade à lúpus dentro da população italiana (D'ALFONSO, 2000).

Chong et al. relatou que um curto alelo com IL-10 (CA repetindo-se \leq 21) tiveram um efeito dose-dependente na suscetibilidade à LES em pacientes chineses oriundos de Hong Kong. (CHONG, 2004).

López *et al* indica a ampla utilização de agentes antimaláricos no tratamento do LES, mesmo que seu mecanismo de ação ainda não esteja bem definida. Entretanto, sabe-se que a resposta ao tratamento é variável entre as pessoas. A alta produção de IL-10 (GG) e a baixa (AA / AG) foram determinadas pela presença do alelo na posição -1082. A relação antimalárica obteve efeito positivo somente quando os pacientes possuíam baixa produção de IL-10 (LÓPEZ, 2006).

3. Justificativa

O LES pode afetar todos os órgãos do corpo. As manifestações mais comuns incluem erupções cutâneas, artrite e fadiga. Nos casos mais graves pode causar nefrite, problemas neurológicos, anemia e trombocitopenia.

Dessa forma, investigar a frequência dos polimorfismos dos genes de IL-10 poderá contribuir para análise do perfil imunológico dos pacientes com LES, possibilitando maior compreensão da imunopatogenia do LES e talvez desenvolver instrumentos diagnósticos e perspectivas terapêuticas cada vez mais individualizados.

Não existem trabalhos sobre a influência da IL-10 no LES no Estado do Amazonas, sendo importante termos uma avaliação do papel deste gene em indivíduos com nossa composição gênica.

Já existe em andamento no âmbito da UFAM um trabalho investigativo de fatores genéticos no lúpus eritematoso sistêmico [25], tendo sido abordado, inicialmente, o gene PDCD-1. A coleção de DNA extraído de casos e controles no Ambulatório Araújo Lima está armazenada e disponível para avaliação de outros polimorfismos. O presente trabalho vai dar continuidade a esse esforço e complementar a avaliação genética do LES na Amazônia.

Por outro lado, a metodologia de amplificação do SNP A/G 1082 do segmento promotor da IL-10 já está dominada no âmbito da UFAM, através do Projeto aprovado pelo CNPq edital Universal de 2007, da prof. Aya Sadahiro em pacientes com tuberculose pulmonar.

Desta forma, temos material genético extraído e a tecnologia de amplificação desenvolvida, o que facilita e justifica a continuidade do trabalho de investigação do LES em pacientes da Amazônia.

4. Objetivos

4.1. Objetivos Gerais

- Investigar fatores genéticos na patogenia do LES em pacientes da Amazônia.

4.2. Específicos

- Determinar a frequência dos alelos A e G na posição 1082 da região promotora do gene da IL-10, em pacientes com LES e nos indivíduos de grupo controle.

- Identificar possível associação entre os alelos de IL-10 e LES e associação com sub-fenótipos clínicos e sorológicos.

5. Metodologia

Em relação aos pacientes e controles do estudo, os seguintes critérios foram utilizados para seleção:

Pacientes: Foram estudados 200 pacientes com o diagnóstico de LES, em conformidade com os critérios do American College of Rheumatology (ACR), sem restrição etária, tratados nas clínicas de Reumatologia e Nefrologia do Ambulatório Araújo Lima da Universidade Federal do Amazonas. Pacientes que satisfaçam 4 critérios do ACR mas cujos sintomas possam ser atribuídos a outra patologia não serão incluídos.

Controles: Foram escolhidos 200 indivíduos saudáveis, adultos, pareados etnicamente, mas sem consangüinidade com os pacientes lúpicos.

5.1 Material e métodos

Este projeto de pesquisa está vinculado ao projeto: Polimorfismos genéticos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico no estado do Amazonas aprovado no Comitê de Ética na Pesquisa da UFAM sob o número 174/2005 em 14 de novembro de 2005.

As amostras de DNA a serem utilizadas no projeto foram coletadas durante o período de 2006 a 2007, e extraídas pela técnica de sais de trimetilamônio, descrito por Gustincich et al. (1991)

5.2. Ensaio de amplificação de DNA para o gene da IL-10 na posição 1082.

O DNA extraído de leucócitos de sangue periférico será utilizado para amplificar a seqüência que inclui o sítio polimórfico G/A na posição -1082 do gene promotor da IL-10, pelo protocolo descrito no trabalho de PAWLIK, et al. (2005). A seqüência alvo (295 pares de bases - pb) será amplificada para os alelos específicos em cada alelo polimórfico A ou G com os *primers* 5'- CTC GCT GCA ACC CAA CTG GC- 3' e 5' - TCT TAC CTA TCC CTA CTT CC - 3'. O DNA genômico (600ng) será submetido à PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em um volume final de 15 µL, contendo 2,5 µL tampão de PCR 10X, 1,1mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,5 µmol/µL de cada *primer* e 1U de

Taq DNA Polimerase. Os parâmetros de amplificação em termociclador serão: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 35 ciclos: 94°C/ 60°C/72°C por 45 segundos para cada etapa e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A mudança realizada durante o transcorrer do projeto em vista de resultados tendenciosos e de artefatos durante a leitura no gel de agarose foi baseada na troca da amplificação alelo específica para a da digestão enzimática.

Depois de nova padronização, como o tempo em que cada etapa levaria e ao aumento no número de ciclos no termociclador, passamos a utilizar novos primers: Primer F277 - GATCTGAAGGAGCAGCAGAAAATT - e Primer IL-10 279R - CAGCTTCGTAGTAGTCCCTGATGACTGCAAAGT. O polimorfismo G/A será detectado após a digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Mnl* I a 37°C “overnight” clivando no sítio CCTC7, sendo obtido um amplicon de 285pb, eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo e visualização em transiluminador de luz ultra-violeta.

Os indivíduos que apresentarem os fragmentos de DNA de 151 pb, 96 pb serão considerados genótipo G/G; os que apresentarem os fragmentos de 131 pb e 128 pb serão genótipo A/A; os que apresentarem os fragmentos de 151 pb, 128 pb, 96 pb serão genótipo G/A.

Em todos os ensaios realizados serão incluídos os controles positivos (+) e negativos (-) da reação de amplificação.

6. Resultados

No começo do trabalho, usamos o método alelo-específico. Nesse processo de amplificação com os primeiros primers dois tubos eram necessários para cada amostra de DNA para a inserção dos diferentes primers respectivos a cada alelo, ou A ou G. Assim, na leitura pelo gel de agarose a identificação dos alelos se dava pela forte reação percebida pela tonalidade da banda e pela seqüência em que eram postos os primers, se primeiro A ou primeiro G, conforme as figuras abaixo.

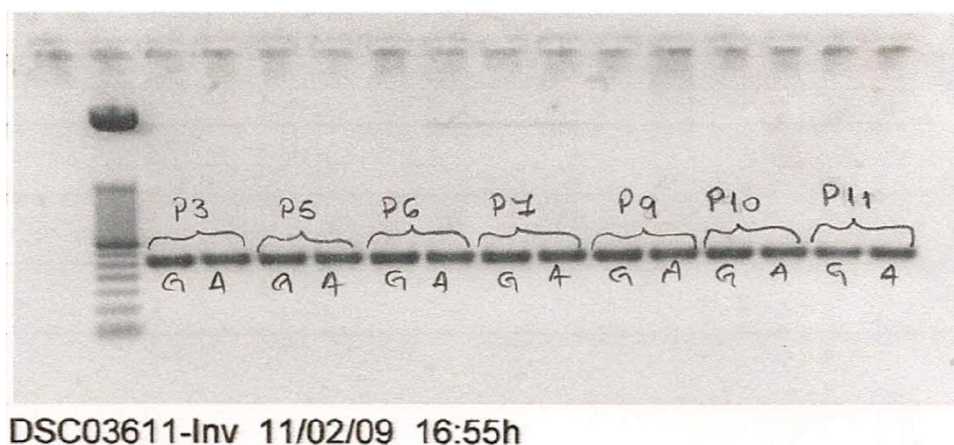


Figura 3 – Gel de agarose a 1,5% com a utilização dos primeiros primers conforme citado no texto. identificação prévia conforme quais primers foram colocados nos respectivos tubos e análise da reação a partir da presença e da tonalidade da banda. A letra P indica que são pacientes e pode-se perceber e os fragmentos possuem 258pb

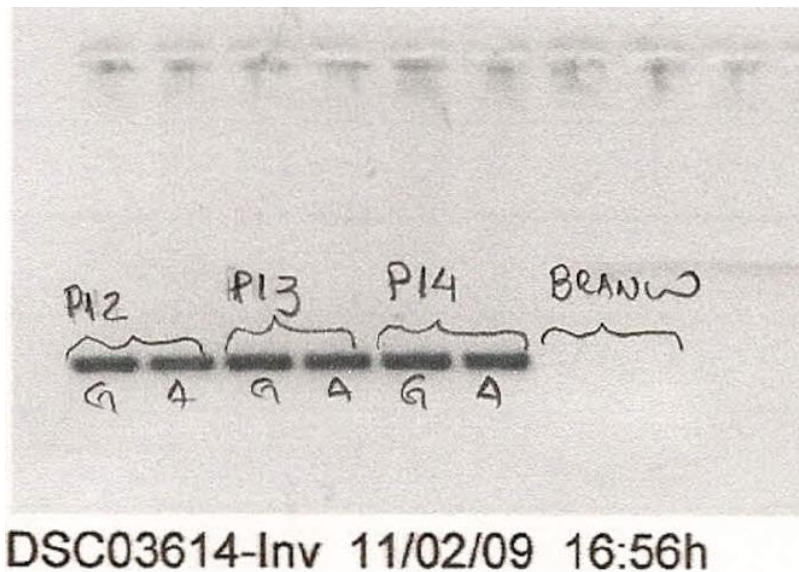


Figura 4 – Continuação do gel anterior, evidenciando o controle negativo – BRANCO – sendo utilizada a água.

Como se pode observar, a predominância de GA é indiscutível nesses géis e não condizente com a literatura.

Dessa forma, mudamos o método para o ensaio com a enzima de restrição *Mnl* I conforme citado na metodologia.

Dessa forma, obtivemos agora fragmentos de 151 pares de bases (pb), 96 pb correspondentes ao genótipo GG; fragmentos de 131 pb e de 128 pb, correspondentes ao genótipo AA; e por último, todos os fragmentos anteriores, ou seja, 151 pb, 131pb, 128 pb, 96 pb, correspondentes ao heterozigoto GA.



Figura 5 – Gel de agarose a 3% com o produto da digestão pela enzima *MnI* do segmento de DNA amplificado do gene IL-10. 151 pares de bases (pb), 96 pb, correspondentes ao genótipo GG; fragmentos de 131 pb e de 128 pb, correspondentes ao genótipo AA; e por último, todos os fragmentos anteriores, ou seja, 151 pb, 128 pb, 96 pb, correspondentes ao heterozigoto GA. A primeira coluna e a última colunas são *ladders* de 50 pb e de 25pb, respectivamente.

A freqüência do alelo G na posição 1082 do gene IL-10 foi de 37,6% no grupo de casos e de 2,77% no grupo controle. Correspondentemente, a freqüência do alelo A foi de 62,3% no grupo de casos e de 97,23% no grupo controle. As freqüências dos genótipos GG, GA e AA no grupo de casos foram 17%, 42% e 41%, respectivamente, 6%, 44% e 50% no grupo controle. Os carreadores do alelo G, isto é, indivíduos GG e GA foram 58,9% no grupo de casos e 50% no grupo controle. Os carreadores do alelo A, isto é, indivíduos AA e GA foram 83,5% no grupo de casos e 94,4% no grupo controle. Não houve diferença significativa estaticamente ($p>0,05$) quanto à freqüência

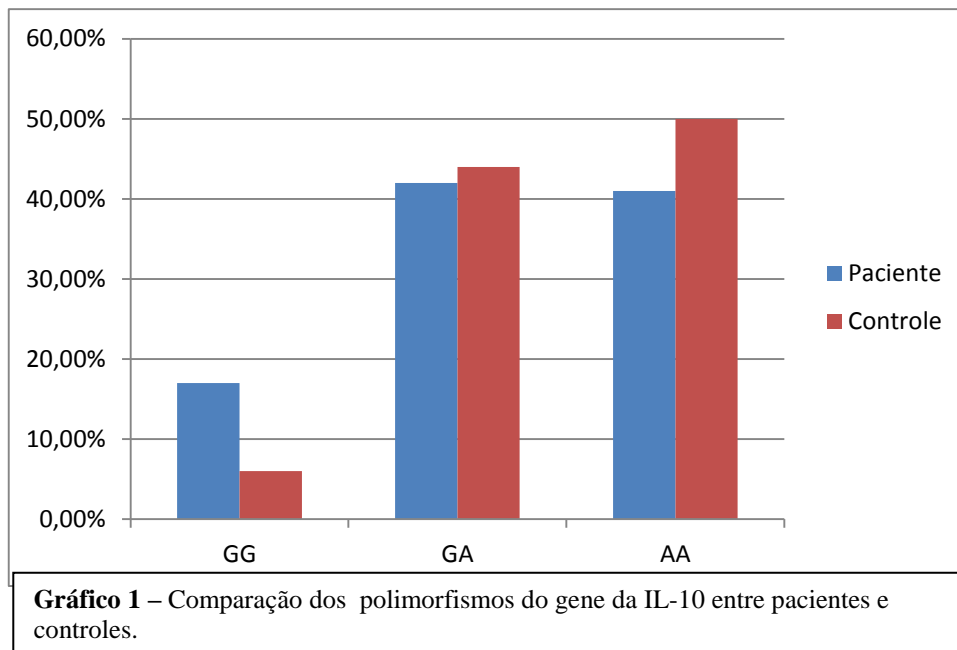
alélica, às frequências genótípicas e a frequência de carreadores entre os dois grupos. Tais dados encontram-se resumidos na Tabela 2.

Genótipo	N	%
GG	12	17%
GA	31	42%
AA	30	41%

Tabela 1 – Polimorfismos do gene IL-10 encontrados nos pacientes com LES.

Genotipagem	Grupo Casos (n=73)	Grupo Controles (n=18)	"p"
Alelo G Alelo A	37,6% (55/146) 62,3% (91/146)	2,77% (10/36) 7,23% (26/36)	0,2672 0,2672
Genótipo GG Genótipo GA Genótipo AA	17% (12/73) 42% (31/73) 41% (30/73)	6% (1/18) 44% (8/18) 50% (9/18)	0,5299 0,8792 0,4942
Carreadores do alelo G Carreadores do alelo A	43 (58,9%) 61 (83,5%)	9 (50%) 17 (94,4%)	0,5309 0,5309
Tabela 2 – Frequências alélica, genotípica e de carreadores do alelo A e G do polimorfismo da posição 1082 do gene IL-10 em indivíduos casos e controles.			

No grupo de casos e no grupo controle as frequências genótípicas esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg não diferem estatisticamente das frequências genótípicas de fato observadas. As duas populações respeitam, portanto, o equilíbrio de Hardy-Weinberg, presumindo-se pan-mixia.



Em uma meta-análise realizada por Nath et al (2005), encontrou-se associação entre a suscetibilidade à doença em pacientes asiáticos com o polimorfismo -1082G da região promotora da IL-10 sugerindo a especificidade em relação à etnia, uma vez que não fora encontrado tal associação em pacientes caucasianos. (Nath et al, 2005).

Chong et al (2004) estudou pacientes lúpicos oriundos de Hong Kong e observou altos níveis de IL-10 nos pacientes com o polimorfismo na região -1082G do gene da IL-10 e associação com LES. Vários estudos indicam que o polimorfismo com o alelo A na posição 1082 está associado com baixa produção de IL-10. A frequência do alelo A mostrou-se em torno de 66,7% e de 70,6% para pacientes e controle, respectivamente. A frequência observada em seu estudo foi de 91% para o genótipo AA, 9,2% para o genótipo GA e de 0,4% para o genótipo GG.

Em seu trabalho, Sung et al (2007), observou menor frequência do alelo G em coreanos, 8,6%, do que os resultados encontrados na literatura como em europeus (50%), africanos (59,5%) e hispano-americanos (67,4%).

Segundo Suárez et al (2004), cuja pesquisa envolveu caucasianos, o genótipo GG esteve associado a alta produção de IL-10, mas esteve mais

associado a forma discóide localizada do que realmente ao LES. Embora o tamanho da amostra não tenha sido significativo (Suárez et al, 2004).

Em pacientes colombianos não se verificou a associação dos polimorfismos com a suscetibilidade à doença. Em tal estudo, Guarnizo-Zuccardi observou uma freqüência de 50% para o genótipo AA, 41,2% para o genótipo GA e de 8,8% para o genótipo GG.

Em nosso estudo, a freqüência do alelo G não foi tão baixa como para os coreanos, mas também não tão alta como para os hispano-americanos, africanos e relativamente para os europeus. Encontramos uma freqüência intermediária entre tais valores, 37,6% para o grupo de pacientes. Os genótipos GA e AA para o grupo de lúpicos esteve bem pareado, com o genótipo GA obtendo 42% e o AA 41% da freqüência. Coube ao genótipo GG a menor freqüência. Dessa forma, a proporção da distribuição das freqüências manteve a de alguns trabalhos, distanciando-se dos coreanos pela elevada freqüência observada no genótipo AA.

7. Conclusão

Não está claro se o polimorfismo –A1082G da região promotora do gene da IL-10 é um marcador de variantes do LES subjacentes em diferentes etnias ou qual a sua função dentre todo um repertório genético influente a ser esclarecido ainda.

O LES é uma doença heterogênea, com muita variabilidade no perfil de autoanticorpos e em suas manifestações. Tal heterogeneidade pode apontar para algum outro polimorfismo causal em diferentes populações do mesmo gene ou em genes vizinhos. Portanto, ainda serão necessários estudos para esclarecer o papel do polimorfismo da IL-10 – A1082G na patogênese do LES. É preciso lembrar dos fatores ambientais como possíveis potencializadores e iniciadores da doença. Mesmo que tal indivíduo possua esse polimorfismo, precisa-se levar em conta inúmeras variáveis que compõem um conjunto como um todo na complexa rede que é a patogênese do LES.

8. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; OBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Editora Ltda, 2005.

CERVINO A.C.L; TSINOREMAS N.F.; HOFFMAN R. **A Genome-Wide Study of Lupus – Preliminary Analysis and Data Release**. New York Academy of Sciences 2007, 131-139.

CHONG W.P.; IP W.K.; WONG W.H.; LAU C.S.; CHAN T.M.; LAU Y.L. **Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus**. Genes Immun. 2004;5:484–92.

CSISZÁR A; NAGY G; GERGELY P; POZSONYI T; PÓCSIK E. **Increased interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE)**. Clin Exp Immunol 2000;122:464–70.

D'ALFONSO S; RAMPI M; BOCCHIO D; COLOMBO G; SCORZA-SMERALDI R; MOMIGLIANO-RICHARDI P. **Systemic lupus erythematosus candidate genes in the Italian population: evidence for a significant association with interleukin-10**. Arthritis Rheum. 2000;43:120–8.

ESKADALE J; GRANT GALLAGHER; COR L VERWEIJ; VIVIAN KEIJSIERS; RUDI G. J. WESTENDORP; TOM W. J. HUIZINGA. **Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes**. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:9465–70

GUARNIZO-ZUCCARDI P. LOPEZ Y; GIRALDO M; GARCIA N; RODRIGUEZ L; RAMIREZ L; URIBE O; GARCIA L; VASQUEZ G. **Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus**. Journal compilation ^a 2007 Blackwell Munksgaard Tissue Antigens 70, 376–382

GIBSON A.W; EDBERG J.C; WU J; WESTENDORP R.G; HUIZINGA T.W; KIMBERLY R.P. **Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus**. J Immunol 2001; 166:3915–22.

GRÖNDAL; GUNNARSSON I; RÖNNELID J; ROGBERG S; KLARESKOG L; LUNDBERG I. **Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus**. Clin Exp Rheumatol 2000;18:565±70.

HARLEY I.T, KAUFMAN K.M., LANGEFELD C.D., HARLEY J.B., KELLY J.A. **Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome wide association studies**. Nature Reviews Genetics Progress 2009 Volume 10, 285-290.

HARLEY J.B; ALARCÓN-RIQUELME M.E; CRISWELL L.A; JACOB C.O; KIMBERLY R.P; MOSER K.L; TSAO B.P; VYSE T.J; LANGEFELD C.D; NATH S.K; GUTHRIDGE J.M; COBB B.L; MIREL D.B; MARION M.C; WILLIAMS A.H; DIVERS J; WANG W; FRANK S.G; NAMJOU B; GABRIEL S.B; LEE A.T; GREGERSEN P.K; BEHRENS T.W; TAYLOR K.E; FERNANDO M; ZIDOVETZKI R; GAFFNEY P.M; EDBERG J.C; RIOUX J.D; OJWANG J.O; JAMES J.A; MERRILL J.T; GILKESON G.S; SELDIN M.F; YIN H; BAECHLER E.C; LI Q.Z; WAKELAND E.K; BRUNER G.R; KAUFMAN K.M; KELLY J.A; **Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci.** Nature Genetics. V.40, N.2, February 2008.

KARAGIANNIDIS C; AKDIS M; HOLOPAINEN P; WOOLLEY N.J; HENSE G; RÜCKERT B; MANTEL P.Y; MENZ G; AKDIS C.A; BLASER K; SCHMIDT-WEBER C.B. **Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma.** J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 1425.

KOMINSKY S; AMORIM R; MONTEIRO E; ABOUHANA R; CÔELHO M.R.C.D. **O papel do vírus Epstein-Barr na etiopatogenia do lúpus eritematoso sistêmico.** Revista Paraense de Medicina V.20 (1) janeiro - março 2006.

LAZARUS M; HAJEER A.H; TURNER D; SINNOTT P; WORTHINGTON J; OLLIER W.E; HUTCHINSON I.V. **Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus.** J Rheumatol. 1997;24:2314–2317.

LÓPEZ P; GÓMEZ J; MOZO L; GUTIÉRREZ C; SUÁREZ A. **Cytokine polymorphisms influence treatment outcomes in SLE patients treated with antimalarial drugs.** Arthritis Res Ther 2006; 8(2): R42

LLORENTE L; RICHAUD-PATIN Y. **The role of interleukin-10 in systemic lupus erythematosus.** J. Autoimmun 2003;20: 287–289.

MANSON, J.J.; RAHMAN A. **Systemic lupus erythematosus.** Orphanet J Rare Dis. 2006; 1: 6.

MOK C.C.; LAU C.S. **Pathogenesis of systemic lupus erythematosus.** J Clin Pathol. 2003, July; 56(7): 481–490.

NATH K.S.; KILPATRICK J.; HARLEY J.B. **Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture.** Current Opinion in Immunology 2004, 16:794–800

NATH K.S.; HARLEY J.B.; LEE Y.K. **Polymorphisms of complement receptor 1 and interleukin-10 genes and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis.** Hum Genet (2005) 118: 225–234.

PASSOS LFS. **Medicina genômica e lúpus eritematoso sistêmico.** Jornal da LIRNNE 2008; 4(1):153:160.

PASSOS LFS. **Polimorfismo genético no gene PDCD1 no lupus eritematoso sistêmico no Amazonas.** Tese de Doutorado em Biotecnologia, UFAM, 2008, orientadora prof. Dra. Maria Cristina dos Santos.

PAWLIK A; KURZAWSKI M; SZKLARZ B. G.; HERCZYNSKA M. DROZDZIK M. **Interleukin-10 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis.** *Clinical Rheumatology*, 24(5): 480-484, 2005.

PISETSKY D.S. **Systemic lupus erythematosus.** A. Epidemiology, pathology and pathogenesis. In: Klippel JH, ed. *Primer on the rheumatic diseases*, 11th ed. Georgia, USA: Arthritis Foundation, 1997:246–51

RHODES B.; VYSE T.J. **The genetics of SLE: an update in the light of genoma-wide association studies.** *Rheumatology* 2008;47:1603–1611

ROSADO S; RUA-FIGUEROA I; VARGAS J.A; GARCIA-LAORDEN M.I; LOSADA-FERNANDEZ I; MARTIN-DONAIRE T; PEREZ-CHACON G; RODRIGUEZ-GALLEGO C; NARANJO-HERNANDEZ A; OJEDA-BRUNO S; CITORES M.J; PEREZ-ACIEGO P. **Interleukin-10 promoter polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus from the Canary Islands.** *Journal compilation 2008 Blackwell Publishing Ltd, International Journal of Immunogenetics* 35, 235–242

RÖNNBLÖM L.; ALM G.V. **Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system.** *Arthritis research & therapy* 5(2):68-75 2003

SUÁREZ A.; LÓPEZ P.; MOZO L.; GUTIÉRREZ C. **Differential effect of IL10 and TNF α genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus.** *Ann Rheum Dis* 2005;64:1605–1610

SUNG Y.K; PARK B.L; SHIN H.D; KIM L.H; KIM S.Y; BAE S.C. **Interleukin-10 gene polymorphism are associated with the SLICC/ACR Damage Index in systemic lupus erythematosus.** *Rheumatology* 2006;45:400–404

VAN OOSTERHOUT A.J.M.; BLOKSMA N. **Regulatory T-lymphocytes in asthma.** *Eur. Respir. J* 2005; 26: 918.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**, Ed Prentice Hall, Inc, Englewood Cliff, New Jersey, 1984. p. 401. 1984.