

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

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO -1082G/A DA
CITOCINA IL-10 E SUA INFLUÊNCIA NA ARTRITE REUMATOIDE**

Bolsista: Rafael Rodrigues Costa Oliveira

MANAUS

2014

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

RELATÓRIO FINAL

PIB – B – 0069/2013

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO -1082G/A DA
CITOCINA IL-10 E SUA INFLUÊNCIA NA ARTRITE REUMATOIDE**

Bolsista: Rafael Rodrigues Costa Oliveira

Orientador: Profº Drº Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes

MANAUS

2014

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	6
Objetivo Geral.....	6
Objetivos Específicos.....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
4. METODOLOGIA	10
4.1 Modelo do Estudo	10
4.2 Informações Éticas.....	10
4.3 Universo de Estudo	10
4.3.1 População de Estudo	10
4.4 Detalhamento dos Procedimentos.....	11
4.4.1 Obtenção de Informações de Pacientes com Artrite Reumatoide	11
4.4.2 Recrutamento de Indivíduos Controles.....	12
4.4.3 Coleta de Sangue e Extração de DNA Genômico.....	12
4.5 Análises Estatísticas.....	13
4.6 Procedimentos de Genotipagem.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1 Características Clínicas e Demográficas da População em Estudo.....	15
5.2 Genotipagem para os polimorfismos estudados.....	15
6. CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

RESUMO

Introdução: A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, de progressão crônica, com etiologia desconhecida, que afeta múltiplos sistemas e cuja progressão leva à deformidade articular e consequente desabilidade física, gerando incapacidade. A IL-10 é uma citocina com potente atividade anti-inflamatória. O polimorfismo -1082G/A é capaz de alterar a produção de IL-10, modificando a intensidade de resposta inflamatória e evolução da doença.

Objetivos: Verificar a frequência do polimorfismo IL10 -1082G/A em pacientes com artrite reumatoide e em uma população controle. Analisar a associação entre o polimorfismo IL10 -1082G/A e a Artrite Reumatoide. Verificar a relação entre o polimorfismo IL-10 -1082G/A e a ocorrência de formas graves de Artrite Reumatoide. **Métodos:** O DNA de 200 controles foi submetido à reação de PCR e posteriormente sequenciado e genotipado para os polimorfismos -1082G/A, -819C/T e -592C/A. **Resultados:** O polimorfismo mais frequente na população controle foi o -819C/T (94%), seguido pelo -596A/C (73,5%) e -1082G/A (41,2%). Os genótipos mais frequentes foram: homozigoto AA – 64,3% (-1082G/A); heterozigoto CT – 53,1% (-819C/T); e homozigoto AA – 44% (-592C/A). **Conclusão:** O polimorfismo mais frequente na população controle foi -819C/T presente em 94% da população com genótipo heterozigoto CT (presente em 53,1% dos indivíduos com polimorfismo -819C/T).

Palavras-chave: Polimorfismo; Interleucina 10 (IL-10); Artrite Reumatoide.

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, de progressão crônica, com etiologia desconhecida e que afeta múltiplos sistemas. A AR se manifesta como uma poliartrite simétrica de pequenas e grandes articulações, cuja progressão leva à deformidade articular e consequente desabilidade física, gerando incapacidade. Pode também apresentar complicações graves por conta de acometimentos extra articulares, como: pericardite, fibrose pulmonar, nódulos reumatóides, neuropatia periférica e amiloidose.

A prevalência de AR na população mundial varia de 0,4% a 1,9%, e no Brasil de 0,2% a 1% (TOBON e colaboradores, 2005). A incidência de AR aumenta progressivamente com a idade, sendo mais frequente no sexo feminino. Segundo o estudo *Global Burden of Disease* de 2000, publicado no *World Health Report* de 2002, a AR é a 31ª principal causa de *Years Lived with Disability* (YLD – anos vividos com desabilidade física), correspondendo a 0,8% do total global de YLD.

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina regulatória homodimérica de 36kDa (FIORENTINO e colaboradores, 1989) produzida principalmente por células T helper, como os monócitos, linfócitos B (KOVACS, 2010) e linfócitos T (MOORE e colaboradores, 1993) cuja principal função é controlar a resposta inflamatória.

O polimorfismo -1082G/A do gene de IL-10 significa uma troca de G (guanina) por A (adenina) (G/A) na posição 1082 da região promotora (sinal negativo “-”) do gene de IL-10. De acordo com Turner e colaboradores (1997), a presença do alelo IL-10 1*A, ao invés do alelo IL-10 1*G, na região promotora 1082 (polimorfismo: -1082G/A) é responsável por uma menor produção de IL-10 independentemente das mutações nas regiões -819 e -592.

Portanto, questiona-se se essa redução da produção de IL-10 é suficientemente significativa ao ponto gerar uma resposta reguladora ineficaz e permitir o desenvolvimento de formas mais graves de artrite reumatoide em portadores do polimorfismo -1082G/A. Dada a grande incapacidade física causada pela artrite reumatoide, o estudo da prevalência do polimorfismo genético do gene de IL-10 e o esclarecimento quanto a sua possível relação com formas mais severas de AR poderiam nos alertar quanto à necessidade de uma estratificação de risco para esses pacientes, ou até mesmo a utilização de medidas mais agressivas no controle da AR.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a frequência do polimorfismo IL10 -1082G/A em pacientes com artrite reumatoide e em uma população controle.

Objetivos Específicos

- a) Analisar a associação entre o polimorfismo IL10 -1082G/A e a Artrite Reumatoide.
- b) Verificar a relação entre o polimorfismo IL-10 -1082G/A e a ocorrência de formas graves de Artrite Reumatoide.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, de etiologia desconhecida marcada por sinovite crônica cuja progressão leva frequentemente a deformidades articulares e incapacidade. Diversos estudos indicaram a presença de citocinas pró-inflamatórias na sinóvia de portadores de AR como responsáveis pela patogenia da inflamação, dentre elas: fator de necrose tumoral α (TNF- α) (CHU e colaboradores, 1991), interleucina 1 (IL-1) (DELEURAN e colaboradores, 1992), interleucina 6 (IL-6) (HIRANO e colaboradores, 1988), fator estimulador de colônia de granulócitos (GM-CSF) (HAWORTH e colaboradores, 1991), interferon γ (INF- γ) e interleucina 2 (IL-2) (STREET; MOSMANN, 1991). Todas essas citocinas apontam o padrão de resposta inflamatória Th1 como predominante na patogenia da AR (MILTENBURG e colaboradores, 1992).

A IL-10 é uma citocina multifuncional capaz de regular a resposta inflamatória. O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1 (1q31-1q32) e é composto por 5 exons (ESKDALE et al., 1992).

A citocina IL-10 tem como fontes principais de produção as células T helper, monócitos, macrófagos e células dendríticas, mas também é produzida por células B, células T citotóxicas, células NK, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos (KUHN et al., 1993). Além disso, pode ser produzida por células não imunes, como queratinócitos e células epiteliais em resposta à infecção, dano tecidual ou a células neoplásicas (OUYANG et al., 2011).

IL-10 é capaz de estimular a proliferação e diferenciação dos linfócitos B, através de (1) estimulação da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC classe II) na superfície dos linfócitos B (GO e colaboradores, 1990), e de (2) estimulação da proliferação e diferenciação dos linfócitos B (ROUSSET e colaboradores, 1992), evidenciando uma atividade estimulatória positiva sobre os linfócitos B.

IL-10 está relacionada com o controle da resposta imune, sendo capaz de inibir a síntese e secreção de citocinas em células com padrão de diferenciação Th1 (FIORENTINO e colaboradores, 1989; KOVACS, 2010). O efeito supressor de IL-10 sobre a resposta Th1 ocorre pelos seguintes mecanismos: (1) IL-10 bloqueia a expressão de moléculas do MHC-II na superfície dos monócitos (DE WAAL MALEFYT e colaboradores, 1991), evidenciando um efeito estimulatório negativo sobre os monócitos e prejudicando a capacidade dos monócitos

de apresentação de antígenos e ativação de células T; (2) IL-10 diminui a expressão de moléculas MHC classe I na superfície de células alvo dos linfócitos T citotóxicos (CTL), reduzindo a atividade citotóxica mediada pelos CTLs (MATSUDA e colaboradores, 1994).

Vários estudos confirmaram a ação anti-inflamatória da IL-10 através da inibição de citocinas pró-inflamatórias, como: TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 (DE WALL MALEFYT e colaboradores, 1991; FIORENTINO e colaboradores 1991), INF- γ e IL-2 (SHER, 1991; TAGA; TOSATO, 1992).

Turner e colaboradores (1997) identificaram mutações em um único nucleotídeo em três regiões promotoras do gene de IL-10: -1082(mutação: G/A), -819(mutação: C/T) e -592(mutação: C/A), capazes de influenciar a produção celular de IL-10.

Segundo Turner e colaboradores (1997), mutações em regiões promotoras dos genes de citocinas alteram o locais específicos de reconhecimento dos fatores de transcrição e levam a uma modificação na atividade transcricional desses fatores, influenciando a produção de citocinas. Os diferentes genótipos associam-se com capacidades diferentes de secreção da citocina IL-10: o genótipo GG apresentou maior secreção de IL-10 em comparação com o genótipo AA (TURNER et al., 1997). Os haplótipos ATA (-1082A, -819T e -592A) e GCC (-1082G, -819C e -592C) estão associados a altos níveis (GCC) e baixos níveis (ATA) de produção de IL-10 *in vitro* (LI et al., 2013). Dado seu caráter anti-inflamatório, uma produção diminuída ou produção aberrante de IL-10, bem como defeitos na sinalização são capazes aumentar a resposta inflamatória e o combate à patógenos, porém, às custas de dano tecidual exagerado e possibilidade de desenvolvimento de doenças autoimunes (GAZZINELLI, 1996)

É sabido que a IL-10 estimula a proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos. Por outro lado, a IL-10 inibe a ação dos monócitos e dos linfócitos T, prejudicando a apresentação celular e imunidade mediada por células (LIU et al., 2013). Dessa forma, polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 podem aumentar as chances de desenvolvimento de doenças autoimunes.

Em uma meta-análise, Liu e colaboradores (2013) demonstraram que a presença do polimorfismo -1082G/A da citocina IL10 está associado ao aumento da suscetibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico (LES) em três genótipos diferentes: G vs A; GG vs AA; GG+GA vs AA. Contudo, o resultado não pode ser generalizado para todas as etnias, pois para a população asiática este resultado não foi verdadeiro, sugerindo que o polimorfismo genético

não é fator independente para o desenvolvimento de LES, devendo haver algum fator ambiental influenciador.

Sheik e colaboradores (2012), em um estudo caso-controle, mostraram associação entre o polimorfismo -1082G/A da IL-10 e a filariose linfática. Sabemos que a IL-10 mantém o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 através da atividade de células T reguladoras, além de ser capaz de diminuir a resposta Th1 como citado anteriormente. Acredita-se que o parasita (filária) cause *down-regulation* da resposta imune através do aumento da produção da citocina IL-10, moldando a resposta imune para um padrão Th2 que inviabiliza a ação de células T efectoras e permite sua sobrevivência perpetuando o estado infeccioso (KING et al., 1993; YAZDANBAKSH et al., 1993; MAIZELS et al., 2003).

Westendorp e colaboradores (1997) afirmam que a capacidade individual de produção de IL-10 em seres humanos varia de acordo com a composição genética do *locus* da IL-10, sendo os fatores genéticos responsáveis por 75% dessa variação e susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças. Apesar de o aumento da produção de IL-10 estar associado com doenças infecciosas (como a filariose linfática), o pesquisador van Exel e seus colaboradores (2002) observaram que níveis diminuídos de IL-10 estão associados a maior inflamação e susceptibilidade ao diabetes tipo 2, e sugeriram que níveis elevados dessa citocina anti-inflamatória poderiam diminuir a propensão ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 nas pessoas com polimorfismo. Contudo, Li e colaboradores (2013) em uma meta-análise acerca do diabetes tipo 2 e polimorfismos no gene da IL-10 demonstraram não haver associação entre os três polimorfismos (-1082G/A, -819T/c e -592A/C) e a doença.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo do Estudo

Foi conduzido estudo descritivo, transversal tipo caso-controle, selecionando-se indivíduos não índios, portadores de AR.

4.2 Informações Éticas

O presente estudo utilizou material biológico proveniente do projeto “Estudo da Genética Molecular da Artrite Reumatoide e da Tuberculose no Amazonas”, que foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP-UFAM) e homologado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Adriano Jorge (CEP-FHAJ) de acordo com as leis brasileiras, CAAE - 0028.0.115.000-0. O material biológico está mantido em biorepositório do Laboratório de Imunologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (UFAM), sob responsabilidade do Prof. Dr. Antônio Luiz Boechat. Para as novas genotipagens, os pacientes serão convidados a assinar novo TCLE para participação no estudo. O presente projeto será novamente submetido para apreciação ética.

4.3 Universo de Estudo

4.3.1 População de Estudo

Pacientes de Artrite Reumatoide, naturais do Amazonas, encaminhados ao Ambulatório de Artrite Reumatoide do Serviço de Reumatologia da FHAJ.

Participantes

Este estudo incluiu pacientes de AR no período de agosto de 2007 a outubro de 2010 desde que completados os critérios de inclusão deste protocolo de pesquisa. Os pacientes de AR encaminhados de serviços de saúde da capital e do interior do Estado ao Ambulatório de Artrite Reumatoide do Serviço de Reumatologia da FHAJ, regularmente acompanhados neste serviço. Foram eleitos e selecionados como controles indivíduos de ambos os sexos, não índios, entre 18 e 75 anos sem história e diagnóstico de quaisquer doenças alérgicas, autoimunes e

crônico-degenerativas. Para tanto, um histórico e exame clínico foi obtido em consulta médica, sendo mantidos no estudo apenas os indivíduos com estes critérios.

Crítérios de Elegibilidade

Crítérios de Inclusão

Foram incluídos: a) os pacientes de AR entre 18 e 75 anos, de ambos os sexos, não índios, preenchendo os critérios de Classificação do Colégio Americano de Reumatologia para diagnóstico da Artrite Reumatoide (FUNOVITS et al., 2010)

Crítérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo: a) pacientes que, durante avaliação inicial tinham critérios de AR, mas que após avaliação sequencial tinham sintomas e sinais sugestivos de outras patologias autoimunes; b) cujos dados clínicos e laboratoriais eram insuficientes para completar as informações deste protocolo;

Amostragem

A partir de ambulatório de referência para atender pacientes de AR na FHAJ (atualmente em funcionamento no Ambulatório Araújo Lima), provenientes de unidades de saúde da capital e interior do Estado do Amazonas. A população em estudo foi definida por método não probabilístico, selecionando-se indivíduos em atendimentos consecutivos, onde todos os pacientes atendidos no Ambulatório no período da pesquisa foram inseridos no estudo, desde que atendessem aos critérios de elegibilidade.

4.4 Detalhamento dos Procedimentos

4.4.1 Obtenção de Informações de Pacientes com Artrite Reumatoide

Para todo paciente de AR selecionado no projeto anterior citato no item 4.1, dados clínicos e laboratoriais foram coletados em formulário próprio separado, anotando Duração da Doença (DD), idade de início (ID), Fator Reumatoide (FR), Velocidade de Hemossedimentação (VHS) e Proteína C Reativa (PC-R) no momento da avaliação, Drogas modificadoras do curso da doença (DMARDS), hemograma, função renal e hepática, glicemia, lipidograma, albumina, uso de drogas Anti-TNF, dose de corticoide em uso com equivalência à prednisona, cirurgia articular prévia (relacionada à AR – artroplastia ou artrodeese), número de anos de educação, número de dias de afastamento do trabalho (definido como incapacidade

legal para trabalho julgado por entidade ou órgão competente). Também foram anotados peso, altura e história de tabagismo.

Os pacientes de AR foram considerados com acometimento predominantemente articular ou sistêmico. Este último, quando pelo menos um dos achados clínicos seguintes foram detectados: nódulos subcutâneos, fibrose pulmonar confirmada por Tomografia Computadorizada de Alta Resolução de tórax, derrame pleural confirmado por radiografia de tórax, derrame pericárdico com evidência ecocardiográfica, Síndrome de Felty (hemograma com leucócitos $< 2 \times 10^6$ células, esplenomegalia), vasculite cutânea (evidencia histopatológica de vasculite leucocitoclástica), neuropatia periférica não compressiva comprovado por eletroneuromiografia, Síndrome de Sjögren (confirmada por Teste de Shirmer, biópsia de glândula salivar menor ou RNM glândulas salivares).

Foi obtida a atividade da doença acordo com o *Disease Activity Score* de 28 juntas doloridas/edemaciadas (DAS28), conforme Prevoo *et al.* (1995), além da medida de qualidade de vida com o *Health Assessment Quality* (HAQ) conforme Fries *et al.* (1980), validado para a língua portuguesa por Ferraz *et al.* (1990) (Anexo 1). Foram considerados casos graves aqueles pacientes que apresentaram pelo menos um dos seguintes: manifestações sistêmicas (conforme definição anterior) e/ou uso de medicação imunobiológica.

Todas as informações obtidas neste estudo foram identificadas com número de registro próprio para todos os pacientes e inseridas em banco de dados produzido no software Microsoft Access 2010® e posteriormente analisadas estatisticamente, utilizando-se o Software R e Minitab 16.

4.4.2 Recrutamento de Indivíduos Controles

Os indivíduos controles foram recrutados nas regiões da cidade próximas as residências dos pacientes de AR ou, ainda, acompanhantes de pacientes do ambulatório desde que não aparentados com os pacientes de AR selecionados anteriormente.

4.4.3 Coleta de Sangue e Extração de DNA Genômico

Dos indivíduos selecionados, após concordarem e assinarem o Termo de Livre Consentimento e Esclarecimento (TCLE) aprovado em Comitê de Ética em Pesquisa, foram realizadas coletas de 5mL de sangue venoso em sistema a vácuo. A extração de DNA foi

realizada pela técnica rápida com sais de brometo de trimetilamônio (DTAB/CTAB), descrito por Gustincich *et al.* (1991), na qual a camada de leucócitos “Buffy Coat”, obtida a partir de sangue centrifugado a 250x *g* por 10 minutos foi misturada com igual volume de tampão de lise: DTAB 12% (DTAB 12%, NaCl 2,25 M, Tris 150mM pH 8,6, EDTA 75mM) e incubada por 10 minutos a 68°C. Após esta etapa, adicionou-se 800μL de clorofórmio, seguindo-se vigorosa agitação e centrifugação à 10.000x *g* por 5 minutos; o sobrenadante foi recuperado e adicionado a 1mL de CTAB 0,5% (CTAB 0,5%, NaCl 0,4 M). Em seguida foi homogeneizado para se obter um precipitado DNA/CTAB. Após nova centrifugação a 10.000x *g* por 5 minutos, o precipitado foi resuspendido em 300μL de NaCl 1,2M e depois em 750μL de etanol absoluto, seguindo-se centrifugação por 5 minutos a 16.000 x *g*. As demais lavagens e centrifugações foram realizadas com etanol 70%. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado posteriormente dissolvido em 100μL de água ultrapura. O DNA extraído foi estocado em microtubo de 500μL (solução estoque), quantificado em espectrofotômetro em 230nm, 260nm, 280nm e anotada razão 260/280. Após a quantificação, as amostras foram diluídas para uma concentração de 50ng DNA/μL em água ultrapura (solução de uso) e utilizadas nas reações de PCR, mantendo-se a solução estoque armazenada em freezer a -20°C.

4.5 Análises Estatísticas

As frequências alélicas e genótípicas foram obtidas pela contagem direta dos alelos, aplicando-se na fórmula: $X=n/2N$, onde *X* representa a frequência relativa do alelo, *n* a frequência absoluta do alelo e *N* o número total de indivíduos. A análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) revelou que os alelos estão em equilíbrio genético para os genes polimorfismos em estudo. A estatística descritiva foi utilizada para apresentar os resultados clínicos e demográficos de pacientes. O qui-quadrado será aplicado para avaliar se as amostras estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como os alelos de risco e as populações controle e doentes. A análise de regressão logística será utilizada para proceder análise multivariada avaliando a influencia dos alelos de risco para as formas graves, aqui consideradas com pacientes com manifestações sistêmicas e alto risco cardiovascular, quando todos os pacientes e controles estiverem genotipados. Todos os testes aplicados serão bicaudais, bem como o nível de significância estatística 0.05.

4.6 Procedimentos de Genotipagem

4.6.1 Reação em Cadeia de Polimerase

A reação de PCR será realizada conforme descrito por SHEIK et al. (2012). Resumidamente, volume total de 25 μ L e 50ng de DNA, 5 μ M de ambos os primers descritos, 1mM dNTP, 1.5mM MgCl₂ e 2,5 μ L de PCR Buffer (10x), além 0.2U de TaqDNA Polimerase. A reação acontecerá com as seguintes condições: denaturação 95°C por 5min, 45 ciclos de 95°C por 20s, 48°C por 15s, 72°C por 30s, com uma fase final de extensão de 72°C por 7min. Os resultados serão analisados em gel de agarose à 1% (alelo G 141bp e alelo A 92 e 49bp).

4.6.2 Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento será realizada com volume total de 10 μ L e 30ng de DNA, 10pM de primer (*forward* ou *reverse*), 2 μ L de tampão 5X, 0,3 μ L de BigDye, completando-se o volume final com água. As condições da reação serão: denaturação 96°C por 1 min, 20 ciclos de 96°C por 10s, 55°C por 15s, 60°C por 2 min, 10 ciclos de 96°C por 10s, 55°C por 15s, 60°C por 3 min. Após ser removida do termociclador, a placa será centrifugada por 2 min a 2.000 RCF. Em seguida serão misturados na mesma proporção 25 μ L de EDTA 125mM e acetato de sódio 3M, adicionando-se 25 μ L de EtOH 100% gelado, e selando-se a placa. O conteúdo será em seguida misturado por inversão (4X). Após, a placa será incubada por 15 min ao abrigo da luz e centrifugada a 3.000 RCF por 30 min. A placa será invertida e submetida a *spin* até 180 RCF por 1 min. Serão adicionados 35 μ L de EtOH 70%. A placa será centrifugada por 15 min à 4°C e 1650 RCF. Em seguida a placa será invertida e submetida a *spin* até 180 RCF. Após será incubada a 52°C por 15 min, Ressuspendida com 10 μ L de formamida Hi-Di e aquecida a 95°C por 1 min até ser colocada no sequenciador. Após a reação de sequenciamento os contigs foram alinhados com a sequencia de referência para o gene IL10 (NCBI) e os SNPs identificados utilizando-se o programa Geneuos 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características Clínicas e Demográficas da População em Estudo.

As populações em estudo, tanto controles como pacientes, forma detalhadamente descritas anteriormente a este trabalho por Boechat et al. 2013.

5.2 Genotipagem para os polimorfismos estudados.

Foi realizado um total de 200 reações de PCR para o grupo controle. Destas reações, 128 amostras foram positivas (bandas nítidas em gel de agarose após reação), ao passo que 72 foram negativas (Figura 1).

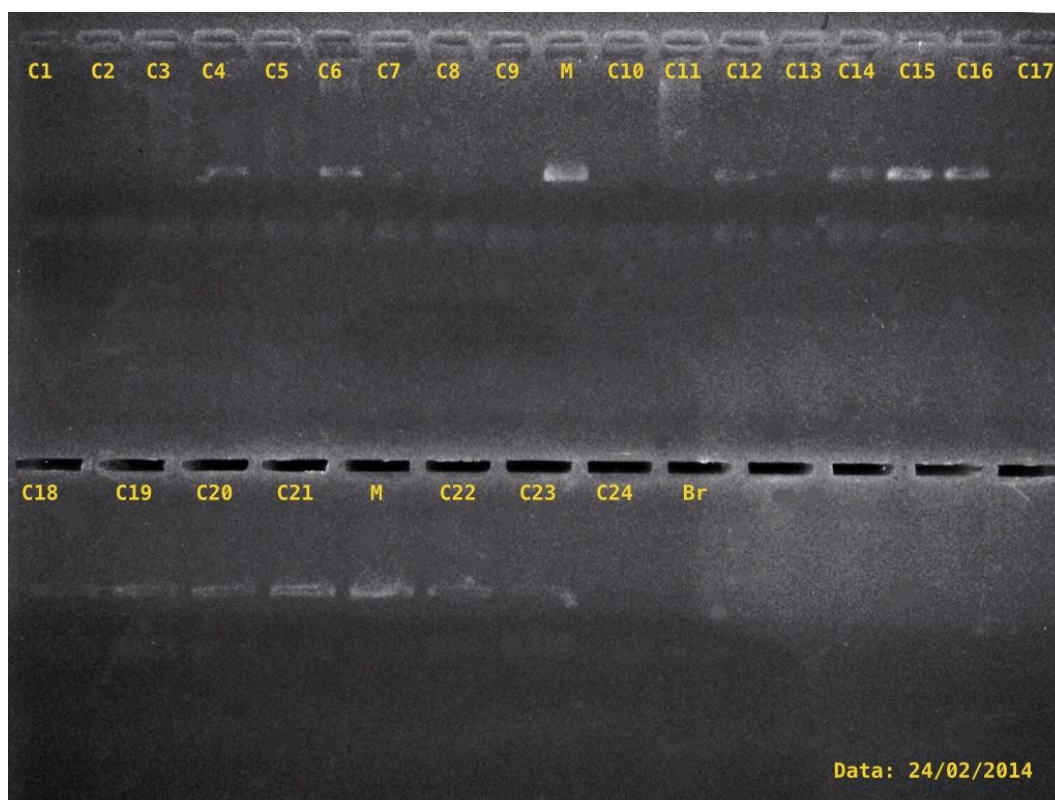


Figura 1: Reação de PCR em Gel de Agarose 1% (Amostras positivas: C4, C6, C12, C14, C15, C16, C18, C19, C20, C21, C22, C23)

Foram realizadas 108 purificações e quantificações, sendo que em uma delas o resultado foi negativo (-0,7 ng/μL), sendo excluída da fase seguinte (sequenciamento). A concentração média de DNA foi de 10 ng/μL (3,2-21,0 ng/μL de DNA).

Das amostras purificadas e quantificadas, 57 foram submetidas à reação de sequenciamento com os primers *forward* e *reverse*, totalizando 114 reações de sequenciamento. Destas, apenas 34 amostras foram positivas e prosseguiram para a fase de genotipagem (Figuras 2 e 3). A Tabela 1 Mostra os resultados referentes à genotipagem de 34 controles realizados até o presente momento.

Tabela 1. Frequência Genotípica para os Polimorfismos de *IL10* estudados.

Polimorfismos		Controles n=32 (%)	Pacientes n= (%)	OR	χ^2	p- valor
IL10 -1082 A/G (n=14) Genótipos	AA	09 (64.3)				
	GA	05 (35.7)				
	GG	00 (00)				
Alelos	A	0.821				
	G	0.179				
IL10 -819 C/T (n= 32) Genótipos	CC	12 (37.5)				
	CT	17 (53.1)				
	TT	03 (9.4)				
Alelos	C	0.641				
	T	0.359				
IL10 -592 A/C (n=25) Genótipos	AA	11 (44.0)				
	AC	10 (40.0)				
	CC	4 (16.0)				
Alelos	A	0.650				
	C	0.350				

Rafael quando se fala em polimorfismo devemos consideram a frequência do alelo mutante, veja a marcação na Tabela.

O polimorfismo mais frequente na população controle foi o -819T (35,9%), seguido de -592C (35%) e -1082G/A (18%). Os genótipos mais frequentes foram: homozigoto AA – 64,3% (-1082A/G); heterozigoto CT – 53,1% (-819C/T); e homozigoto AA – 44% (-592C/A). Os genótipos menos frequentes foram: homozigoto GG – 0% (-1082G/A); homozigoto TT – 9,4% (-819C/T); e homozigoto CC – 16% (-592C/A).

Algumas dificuldades como a demora na aquisição dos primers para reação de PCR e a baixa concentração de DNA das amostras após a purificação impediram a realização de mais reações de sequenciamento e prejudicaram o resultado positivo de reações realizadas em algumas amostras controles devido à baixa concentração de DNA. Contudo, os resultados obtidos até o momento são inéditos: os heterogramas abaixo mostram duas mutações próprias

da nossa população não descritas anteriormente, mas o significado delas ainda é incerto dependendo do final das nossas análises. Além disso, é a primeira vez que uma população controle é analisada para esta região do genoma na Amazônia. Tendo em vista a repercussão das dificuldades mostradas nos objetivos propostos, o projeto foi renovado com o intuito de darmos continuidade às reações dos controles que faltam e iniciarmos os procedimentos para pacientes com AR.

O número de indivíduos genotipados com sucesso para *IL10* -1082G/A pode ter sido baixo por conta da impossibilidade de leitura do polimorfismo que se encontrava nas extremidades da região de corte dos primers no sequenciamento de algumas amostras. Isto pode ter afetado a qualidade do sequenciamento nesta região.

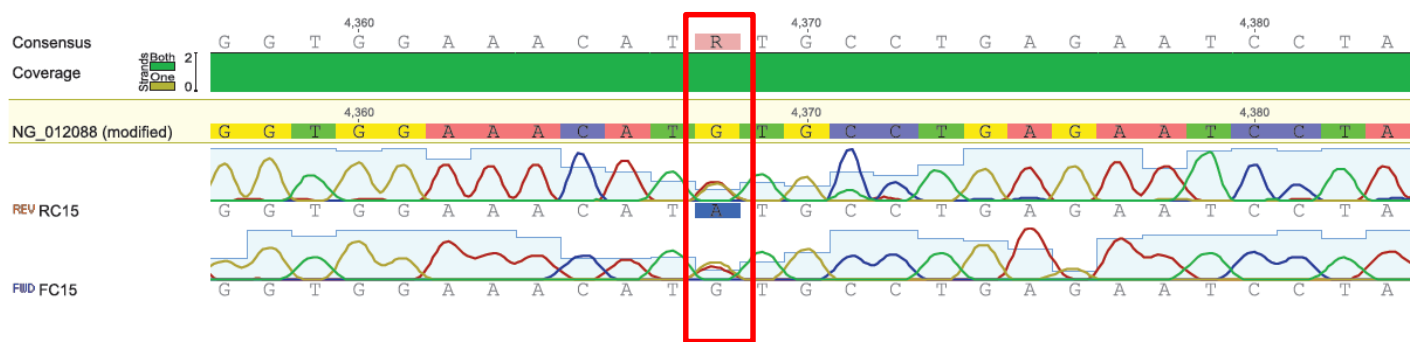


Figura 2: Resultado da reação de sequenciamento com os primers *forward* e *reverse* do controle C15. Muta  o pontual identificada.

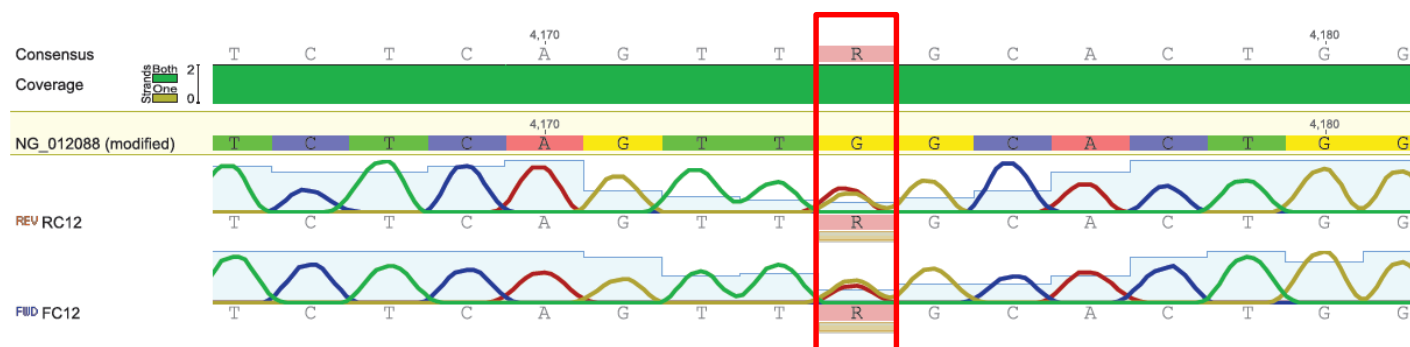


Figura 3: Resultado da rea  o de sequenciamento com os primers *forward* e *reverse* do controle C12. Muta  o pontual identificada.

6. CONCLUSÃO

O polimorfismo mais frequente na população controle foi o -819C/T (94%), seguido pelo -596A/C (73,5%) e -1082G/A (41,2%). Os genótipos mais frequentes foram: homozigoto AA – 64,3% (-1082G/A); heterozigoto CT – 53,1% (-819C/T); e homozigoto AA – 44% (-592C/A).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOECHAT, A.L. et al. **The Influence of TNF gene on severity of Rheumatoid Arthritis in the Brazilian Amazon.** Cytokine, 61, 402-413, 2013.
2. CHU, C. Q.; FIELD, M.; FELDMANN, M.; MAINI, R.N. **Localization of tumor necrosis factor et in the synovial tissues and at the cartilage-pannusjunction in patients with rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum. 34, 1125, 1991.
3. DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; DE VRIES, J. E. **Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.** Journal of Experimental Medicine. 174, 1209, 1991.
4. DELEURAN, B.; CHU, C. Q.; FIELD, M.; BRENNAN, F.M. KATSISK, P.; FELDMANN, M.; MAINI, R.N. **Localization of interleukin 10 (IL-10) and type 1 IL-1 receptor and interleukin 1 receptor antagonist protein in the synovial membrane and cartilage/pannus junction in rheumatoid arthritis.** Br.J. Rheum, 31, 801-809, 1992.
5. ESKDALE, J.; KUBE, D.; TESCH, H.; GALLAGHER, G. **Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence.** Immunogenetics, 46, 120-128, 1997.
6. FERRAZ, M. B.; OLIVEIRA, L. M.; ARAUJO, P. M.; ATRA, E.; TUGWELL, P. **Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire.** J. Rheumatol., 17, 813-7, 1990.
7. FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. **Two types of mouse T helper cell. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones.** Journal of Experimental Medicine, 170, 208 I, 1989.
8. FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R. HOWARD, M. O'GARRA, A. O. **IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.** Journal of Immunology, 147, 38, 15, 1991.
9. FRIES, J. F.; SPITZ, P.; KRAINES, R. G.; HOLMAN, H.R. **Measurement of patient outcome in arthritis.** Arthritis Rheum., 23, 137-45, 1980.
10. FUNOVITS, J.; ALETAHA, D.; BYKERK, V.; COMBE, B.; DOUGADOS, M.; EMERY, P. et al. **The 2010 American college of rheumatology/european league against rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I.** Ann. Rheum. Dis., 69, 1589-95, 2010.
11. GAZZINELLI, R. T. **In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with Toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α .** J Immunol., 157, 798-805, 1996.
12. GO, N. F.; CASTLE, B. E.; BARREIT, R.; KASTELEIN, R.; DANG, W., MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W.; HOWARD, M. **Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells.** Journal of Experimental Medicine, 172, 1625, 1990.
13. GUSTINCICH, S.; MANFIOLETTI, G.; DEL SAL, G.; SCHNEIDER, C.; CARNINCI, P. **A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood.** Biotechniques, 11, 2, 298-300, 1991.
14. HAWORTH, C.; BRENNAN, F. M.; CHANTRY, D.; TURNER, M.; MAINI, R. N. FELDMANN, M. **Expression of granulocytemacrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- α .** Eur.J. Immunol., 21, 2575, 1991.

15. HIRANO, T.; MATSUDA, T.; TURNER, M.; MIYASAKA, N.; BUCHAN, G.; TANG, B. SATO, K.; SHIMIZU, M.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; KISHIMOTO, T. **Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis.** Eur. J. Immunol., 18, 1797, 1988.
16. KING, C. L.; MAHANTY, S.; KUMARASWAMI, V.; et al. **Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis: preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset.** J. Clin. Invest., 92, 1667, 1993.
17. KOVACS, E. **Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells?** Leukemia Research, 34, 912–916, 2010.
18. KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MULLER, W. **Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.** Cell, 75, 263–74, 1993.
19. LI, J.; WU, S.; WANG, M. R.; WANG, T. T.; ZHU, J. M. **Association of the interleukin-10 -592A/C, -1082G/A and -819T/C gene polymorphisms with type 2 diabetes: A meta-analysis.** Gene, 521, 211–216, 2013.
20. LIU, P.; SONG, J.; SU, H.; LI, L.; LU, N. et al. **IL-10 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis.** PLoSONE8(7):e69547.doi:10.1371/journal.pone.0069547, 2013.
21. MAIZELS, R. M., YAZDANBAKSHI, M. **Regulation of the immune response by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms.** Nat. Rev. Immunol., 3, 733, 2006.
22. MATSUDA, M. SALAZAR, F. PETERSSON, M. MASUCCI, G.; HANSSON, J.; PISA, P.; ZHANG, Q. J.; MASUCCI, M. G.; KIESSLING, R. **Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression.** Journal of Experimental Medicine, 180, 237 I, 1994.
23. MILTENBURG, A. M. M.; VAN LAAR, J. M.; KNIPER, R. D.; DAHA, M. R.; BREEDVELD, F. C. **T cell clones from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the TH1 subset.** Scand. J. Immunol., 35, 603, 1992.
24. MOORE, K. W.; O 'GARRA, A. DE WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA, P.; MOSSMANN, T. R. **Interleukin.** Annual Reviews of Immunology. 1 I, 165, 1993.
25. OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. **Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease.** Annu Rev Immunol., 23, 29, 71–109, 2011.
26. PREVOO, M. L.; VAN 'T HOF, M. A.; KUPER, H. H.; VAN LEEUWEN, M. A.; VAN DE PUTTE, L. B.; VAN RIEL, P. L. **Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum, 38, 44–8, 1995.
27. ROUSSET, F.; GARCIA, E. DEFRANCE, T.; PERONNE, C.; VEZZIO, N.; HSU, D. H. KASTELEIN, R.; MOORE, K. W.; BANCHEREAU, J. **Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes.** Proceedings of the National Academy of Science USA, 89-1890, 1992.
28. SHEIK, Y. et al. **Association of IL10 and IL10RA polymorphism with Lymphatic Filariasis in South Indian Population.** International Journal of Tropical Disease and Health. In press, 2013.
29. SHER, A.; FIORENTINO, D. CASPAR, P.; PEARCE, E.; MOSSMANN, T. R. **Production of IL-10 by C M + T lymphocytes correlates with down-regulation of Th I cytokine synthesis in helminth infection.** Journal of Immunology. 147, 2713, 1991.

30. STREET, N. E.; MOSMANN, T. R. **Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns.** FASEB (Fed. Am. SoL Exp. Biol.) J. 5, 171, 1991.
31. TAGA, K. ; TOSATO, G. **IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production.** Journal of Immunology, 148, 1143, 1992.
32. TOBON, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. **The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis.** Autoimmun Rev 9, A288–292, 2010.
33. TURNER, D. M.; WILLIAMS, D. M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. **An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter.** Blackwell Science Ltd. European Journal of Immunogenetics 24, 1-8, 1997.
34. VANEXEL, E.; GUSSEKLOO, J.; DECRAEN, A. J. M.; FRÖLICH, M.; BOOTSMA-VANDERWIEL, A.; WESTENDORP, R. G. J. **Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type2 diabetes: the Leiden 85 – Plus Study.** Diabetes, 51, 1088–1092, 2002.
35. WESTENDORP, R. G.; LANGERMANS, J. A.; HUIZINGA, T. W.; ELOUALI, A. H.; VERWEIJ, C. L.; BOOMSMA, D. I.; VANDENBROUCKE, J. P. **Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease.** Lancet, 349, 170–173, 1997.
36. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life.** Geneva: WHO, 2002.
37. YAZDANBAKHS, M.; PAXTON, W. A.; KRUIZE, Y. C. M., et al. **T cell responsiveness correlates differentially with antibody isotype levels in clinical and asymptomatic filariasis.** J. Infect. Dis., 167, 925, 1993.