

ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMO DE *IL17A* E *IL17F* E SUA ASSOCIAÇÃO COM PACIENTES COM ESPONDILOARTROPATIAS

Jean Lucas Meneguetti (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Marco Antonio Rocha Loures, Luciana Conci Macedo, Jeane Eliete Laguilha Visentainer (Orientadora), e-mail: jelvisentainer@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Departamento de ciências básicas da saúde - Imunogenética

Palavras-chave: Gene *IL17*, polimorfismo genético, espondiloartrites.

Resumo

Espondilartropatias (EpA) são doenças inflamatórias da articulação com envolvimento preferencial pelo esqueleto axial. Neste estudo, analisou-se a frequência e associação dos polimorfismos *IL17A* e *IL17F* em 200 pacientes com EpAs e 200 controles. Foram coletadas amostras de sangue periférico, o DNA foi extraído pelo método *salting-out* e a genotipagem dos polimorfismos *IL17A* e *IL17F* realizada pelo método RFLP. Após a obtenção dos genótipos, analisou-se o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, a frequência desses polimorfismos e sua associação com as EpA, por meio do programa *OpenEpi* e o software SNPStats. Obteve-se que os genótipos A/G e T/C e que os alelos A e C de *IL17A* e *IL17F*, respectivamente, estão associados à susceptibilidade e gravidade das EpA. Estes dados podem complementar estudos futuros, em vista da escassa literatura considerando os parâmetros avaliados.

Introdução

Espondiloartropatias são um grupo de doenças inflamatórias, crônicas, auto-imunes, que incluem algumas doenças distintas, porém com algumas características em comum que possuem aspectos clínicos como dor axial inflamatória, associada à artrite, predominante em grandes articulações de membros inferiores e entesopatias periféricas, achados radiológicos (sacroilíte) e laboratoriais (soronegatividade para o fator reumatóide) e indivíduos com predisposição genética (BROWN, M.A. et al., 1997).

As interleucinas *IL-17A* e *IL-17F* são citocinas pró-inflamatórias produzidas em larga escala por uma subpopulação de linfócitos T auxiliares denominados linfócitos Th17, além de serem produzidas por outras células como macrófagos, células dendríticas, células exterminadoras naturais (NK) e tecido linfóide induzido por células T gama e delta. Tais interleucinas são produzidas tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (HAROON M et al., 2015), além de possuírem efeitos citotóxicos, induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina-1 β e interleucina-6, causando também dano tecidual generalizado. A expressão de interleucinas é rigidamente controlada, porque

uma superprodução sistêmica destas citocinas ativa respostas inflamatórias à infecção e lesão, com dano tecidual generalizado (ABBAS et al., 2015).

As IL-17A e 17F são potentes citocinas pró-inflamatórias e moduladores imune, com destaque para o dano articular e que em estudos a sinalização de receptores de *IL17* é determinante para evolução de uma sinovite aguda para uma artrite destrutiva crônica. Sendo assim, consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de EpAs (LUBBERTS E. 2008). O presente estudo propõe uma análise da frequência e associação dos polimorfismos da *IL17* em pacientes com EpA e controles da região do norte do Paraná e buscar, assim, alguma relação com as espondiloartropatias e a IL-17.

Materiais e métodos

O projeto está de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (UEM) com o CAAE 27723114.0.0000.0104. Os pacientes foram triados em clínica de reumatologia particular e pelo ambulatório de reumatologia do Hospital Universitário de Maringá e encaminhados ao Laboratório de Imunogenética do departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá para a coleta de amostras de sangue e extração de DNA utilizando a técnica de *salting-out*.

Foram avaliados os polimorfismos *IL17A* (rs2275913) e *IL17F* (rs763780) utilizando o método de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) após a amplificação das sequências por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi seguida uma técnica de RFLP já padronizada no laboratório com as seguintes enzimas de restrição e os seus respectivos primers (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos primers, tamanho dos fragmentos gerados e das enzimas restrição para os SNPs das *IL17A* e *IL17F*

SNP da IL	Sequências dos primers	Tamanho dos fragmentos	Enzima de restrição
G197A (rs2275913)	5-AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT-3 5-CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3	68pb+34pb;102pb+ 68pb+34pb; 102pb	EcoNI
T7488C (rs763780)	5-ACCAAGGCTGCTCTGTTTCT-3 5-GGTAAGGAGTGGCATTCTA-3	63+80pb; 143pb+80pb+63pb;14 3pb	NlaIII

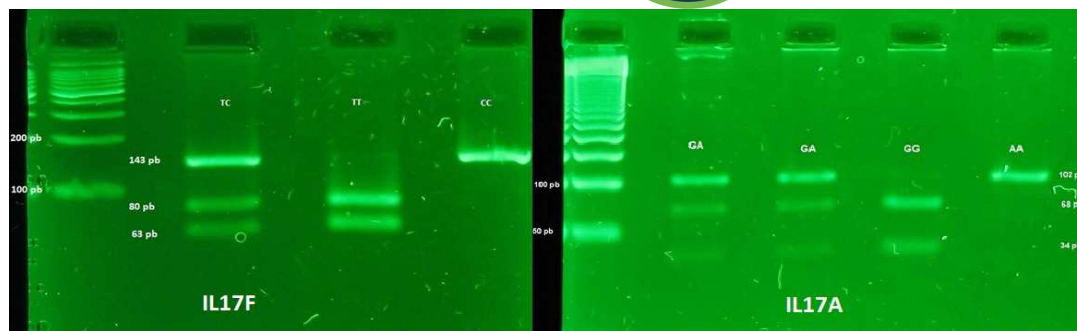


Figura 01. Genotipagem da *IL17F* e *IL17A*

As frequências alélicas e genóticas para os polimorfismos analisados entre pacientes e controles foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates, com tabelas de contingência 2x2 e o risco foi avaliado por *Odds ratio*, considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%, utilizando o programa SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php>).

Resultados e Discussão

Conforme dados apresentados na Tabela 2, em relação à *IL17A*, observou-se uma alta frequência no genótipo A/G em pacientes com EpA, frente aos controles. *IL17F* mostrou uma alta frequência do alelo C e do genótipo C/C nos pacientes com EpA.

Foi verificado uma associação significativa dos polimorfismos de *IL17A* e *IL17F*, alelo A (OR=1,9; IC-1,48–2,6) e o alelo C (OR=1,97; IC=1,29–3,01) respectivamente, com as EpA e dos genótipos (A/G+A/A) no modelo dominante da *IL17A* [OR (95%IC):1,60 (1,10-2,32)] nas EpA, EA [OR (95%IC):1,57 (1,05-2,35)] e AP [OR (95%IC):2,56 (1,06-6,21)] e dos genótipos (T/C+C/C) no modelo dominante da *IL17F* [OR (95%IC):4,53 (2,68-7,65)] nas EpA, EA [OR (95%IC):3,88 (2,22-6,77)] e AP [OR (95%IC):6,04 (3,11-11,75)] em relação ao grupo controle.

Tabela 2. Frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos *IL17A* e *IL17F* em pacientes com espondiloartrites e controles.

Genótipos e alelos	Pacientes EpA N= 200 (%)	Controles N= 200 (%)	Espondilite Anquilosante (EA) N = 131 (%)	Artrite Psoriásica (AP) N =64(%)
IL17A				
A/A	41 (21%)	29 (14%)	28 (22%)	12 (18,75%)
A/G	128 (64%)	85 (42%)	81 (62%)	43 (67,18%)
G/G	31 (15%)	86 (43%)	22 (16 %)	9 (14,06%)
A	210 (53%)	143 (36%)	137 (52%)	67 (52,34%)
G	190 (47%)	257 (64%)	125 (48%)	61 (47,65%)
IL17F				
C/C	143 (71%)	2 (1%)	87 (66%)	52 (81,25%)
T/C	44 (22%)	52 (26%)	37 (28%)	6 (9,3%)
T/T	13 (7%)	146 (73%)	7 (6%)	6 (9,3%)

C	330 (82%)	56 (14%)	211 (80%)	110 (85,93%)
T	70 (18%)	344 (86%)	44 (20%)	18 (32,81)

Conforme pode ser exemplificado por ZACARIAS et al. (2015), houve suscetibilidade à periodontite crônica em pacientes com o genótipo A/A da *IL17A*, o que denotou, dessa forma, o papel importante desta interleucina na inflamação crônica, o que poderia levar à inferência de que o alelo A, que é mutante, possui relação em diversas patologias que apresentam inflamação crônica.

Conclusões

Pode-se concluir que os polimorfismos dos genes *IL17A* e *IL17F* estão associados às EpAs. Podemos sugerir que os indivíduos que possuem determinados polimorfismos em genes de citocinas podem desenvolver sérias complicações fisiopatológicas das EpAs e suas formas clínicas. Assim, estudos com um maior número de pacientes e com outras populações étnicas poderiam contribuir para a compreensão da imunopatogênese dessas doenças multifatoriais. Além disso, a avaliação desses fatores genéticos poderia auxiliar no diagnóstico preditivo de formas mais graves da doença, direcionando o tratamento dos pacientes.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio da bolsa PIBIC e ao laboratório de Imunogenética pelo suporte técnico e financeiro.

Referências

ABBAS, A, K. LICHTMAN, A, H. PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

BROWN, M.A. et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum.* 1997;40(10):1823-8

HAROON, M. et al. Diagnostic delay of more than 6 months contributes to poor radiographic and functional outcome in psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(6):1045-50.

LUBBERTS E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine.* 2008;41:84–91.

ZACARIAS, J. M. V, SIPPET, E. A, TSUNETO, P.Y, VISENTAINER, J.E, OLIVEIRA E SILVA, C. SELL, A. M. et al. The influence of interleukin 17A and 17F polymorphisms on chronic periodontitis disease in Brazilian patients. *Med Inflamm*2015;2:1-8.