

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PCR-SSP PARA DETECÇÃO DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DO GENE HUMANO CODIFICADOR DE INTERLEUCINA 10 (IL-10)

Francielle Regina Silva Dias (PIC/CNPq/Uem), Larissa Danielle Bahls Pinto (Orientador), e-mail: laribahls@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/
Departamento De Ciências Básicas da Saúde - DBS /Maringá, PR.

Imunologia/ Imunogenética

Palavras-chave: Técnicas de genotipagem, Interleucina-10, PCR-SSP

Resumo:

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina produzida por diferentes células do sistema imune e possui um papel imunomodulador muito importante, podendo atuar tanto como supressora quanto como estimuladora da resposta imune, dependendo do contexto em que é produzida, estudar o polimorfismo que ocorre na posição -1082 (G/A) da região promotora, os quais estão envolvidos na regulação da expressão desta citocina, permitirá compreender melhor a imunopatologia de diferentes doenças. O objetivo deste trabalho foi padronizar e otimizar uma metodologia molecular rápida, simples e confiável para genotipagem de uma mutação conhecida na posição -1082(A/G) do gene humano que codifica a IL-10. Foi possível a padronização da técnica de PCR-SSP para o alelo A, entretanto, não houve tempo hábil para completar a padronização da amplificação do alelo G.

Introdução

A interleucina 10 (IL-10) pertence à família das citocinas tipo II, e é produzida por uma grande variedade de células do sistema imune, como monócitos, macrófagos e subgrupos de células T, em especial por células T reguladoras (Treg) (REF - Sabat). Embora o principal papel desta citocina seja inibir a resposta imunológica (Mocellin et al., 2003), estudos mostram que a mesma também pode estimular o sistema imune em determinadas situações, levando à ativação de linfócitos T citotóxicos, células NK e linfócitos B, (Conti et al., 2003; Mosser e Zhang, 2008). A IL-10 pode ainda, funcionar como um fator de crescimento que estimula a proliferação de determinados subtipos de linfócitos T CD8+ (Mosser e Zhang, 2008).

Em humanos, o gene codificador da citocina IL-10 está localizado no cromossomo 1q21-32, possui cerca de 4,7 kb de comprimento e é constituído por cinco éxons, separados por quatro íntrons. Sabe-se que

polimorfismos localizados na região 5'-flanqueadora do gene da IL-10 como dois microssatélites de sequências (CA) repetitivas e mutações de um único nucleotídeo (SNP – single nucleotide polymorphism) nas posições -1082(G/A), -819(C/T), e -592(C/A) estão envolvidos na regulação da produção de IL-10.

Diferentes metodologias baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR - polymerase chain reaction) já foram desenvolvidas e utilizadas para detectar os polimorfismos anteriormente citados, a técnica utilizada nesse trabalho foi SSP (sequence specific primer) em que a reação em cadeia da polimerase é realizada utilizando primers alelo-específicos.

Materiais e métodos

Amostras

Foram utilizadas como controles amostras previamente genotipadas no nosso laboratório pela metodologia de PCR-SSO, baseada no uso de sondas marcadas alelo-específicas, e DNAs controles do laboratório de imunogenética da UEM. Para obtenção do DNA genômico foi utilizada técnica de extração "saunting-out". Após lavagem do DNA precipitado, o mesmo foi hidratado e armazenado a -20°C até o uso. As concentrações de DNA extraído foram determinadas por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA) e posteriormente diluídas em água para atingir a concentração de uso (50 ng/μL).

Padronização da PCR-SSP

As primeiras reações de PCR-SSP foram realizadas de acordo com o proposto por Vinod e colaboradores (Vinod et al., 2015) em um volume final de 15 μL, contendo 50 ng de DNA molde, 0,2 mM dos iniciadores específicos (Tabela 1) e dos primers que amplificam o gene do crescimento (HGH), 120μM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão 0,5 X (100 mM Tris-HCL pH 8,3, 250 mM KCL), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA), 2 ng/μL. As condições de ciclagem iniciais foram: 5 minutos à 95°C, seguido de 25 ciclos com 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 63°C e 30 segundos à 72°C e um alongamento final à 72°C, durante 5 minutos.

Tabela 1. Iniciadores alelo aspecíficos para o polimorfismo -1082 (A/G) na região promotora do gene IL-10

Iniciadores	Sequências
Iniciador Comum	5'-CAGCCCTTCCATTTTACTTTC-3'
Iniciador - alelo G	5'-TACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3'
Iniciador - alelo A	5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAA-3'

Resultados e Discussão

Mix 1 (alelo G)

Após observarmos baixa sensibilidade, a concentração de $MgCl_2$ foi aumentada para 2 mM, conseguindo assim verificar a amplificação dos controles que sabidamente possuíam o alelo A. A fim de utilizar menor quantidade de reagente, o volume total da reação foi reduzido para 10 μL , mantendo a mesma concentração dos reagentes e a mesma quantidade de Taq polimerase (5 U), porém verificou-se a presença de bandas inespecíficas com o mesmo peso molecular do amplicon esperado. Como o volume de Taq por reação já estava muito pequeno (0,1 μL), decidiu-se novamente reduzir a concentração de $MgCl_2$ para 1,5 mM na tentativa de aumentar a especificidade da reação. As bandas inespecíficas foram eliminadas, porém a banda controle (HGH) ficou bastante fraca, assim, a concentração de DNA foi aumentada para 75 ng/ μL . O aumento do DNA diminuiu a especificidade do teste. Então a concentração de DNA foi novamente reduzida para 50 ng/ μL , entretanto ainda foi possível observar a presença de bandas inespecíficas. Dessa forma foi realizado um gradiente de concentração de $MgCl_2$ utilizando concentrações de 1,8 mM, 1,5 mM e 1,2 mM. Após amplificação foi observada presença de bandas inespecíficas nos três casos. Com este resultado suspeitamos de que tenha ocorrido contaminação de um dos reagentes do mix com o iniciador específico para o alelo A. Porém, não houve tempo hábil para adquirir novos reagentes e verificar esta hipótese.

Mix 2 (alelo A)

Ao realizarmos o protocolo inicial uma das amostras controles que sabidamente possuía o alelo A (147A) não foi amplificada. Assim, aumentou-se a concentração de $MgCl_2$ para 2 mM, no entanto todas as amostras amplificaram um fragmento de 550 pb. Assim, concluiu-se que a concentração de $MgCl_2$ de 1,5 mM apresentou maior especificidade. Da mesma maneira que realizou-se para o Mix 1, o volume total da reação foi reduzido para 10 μL , mantendo a mesma concentração dos reagentes e a mesma quantidade de Taq polimerase (5 U), a fim de utilizarmos uma menor quantidade de reagentes. Obtendo um bom resultado. Juntamente com o teste feito para o Mix 1, foi feito um gradiente da concentração de $MgCl_2$ para o Mix 2, no intuito de determinar quais concentrações permitiam o bom funcionamento da reação. Foram testadas as concentrações de 1,8 mM, 1,5 mM e 1,2 mM de $MgCl_2$ e observamos que a concentração 1,2 mM possui baixa sensibilidade, enquanto com as outras duas (1,8 mM e 1,5mM) foi possível observar tanto a banda do amplicon (550pb) quanto do controle de amplificação, HGH, 431 pb. Sendo assim, seria possível trabalhar com estas concentrações. Porém como a concentração de 1,8mM apresentou melhor resolução, esta foi a concentração escolhida. No projeto ainda eram prevista a padronização da PCR-SSP a genotipagem de amostras de 50 voluntários

saudáveis, utilizando a metodologia padronizada. Entretanto, por falta de tempo hábil durante o projeto isto não foi possível.

Conclusões

Foi possível realizar a padronização da metodologia PCR-SSP para detecção do alelo A no polimorfismo -1082 (A/G) na região promotora do gene IL-10. Entretanto, devido a problemas encontrados ao longo do desenvolvimento do projeto e à falta de tempo hábil, não foi finalizada a padronização da reação para detecção do alelo G na mesma posição.

Agradecimentos

À Capes/CNPQ e ao Laboratório de Imunogética da Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade de ter acesso a novos conhecimentos que nos enriqueceram e com certeza nos ajudarão para o nosso desenvolvimento no futuro.

Referências

CONTI, P. et al. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. **Immunology Letters**, v. 86, n. 2, p. 123-129, 4/3/ 2003. ISSN 0165-2478.

MOCELLIN, S. et al. The dual role of IL-10. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 36-43, 1// 2003. ISSN 1471-4906.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological reviews**, v. 226, p. 205-218, 2008. ISSN 0105-2896 1600-065X.

SABAT, R. IL-10 family of cytokines. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 5, p. 315-24, Oct 2010. ISSN 1359-6101.

VINOD, C. et al. A Common SNP of IL-10 (-1082A/G) is Associated With Increased Risk of Premenopausal Breast Cancer in South Indian Women. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 8, n. 4, p. e3434, 2015. ISSN 2008-2398 2008-2401.