

## ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE IL8 COM AS ESPONDILOARTROPATIAS

Jean Lucas Meneguetti (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Jeane Eliete Laguila 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.**

**Palavras-chave:** Gene IL8, 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 do polimorfismo *IL8* em 173 pacientes com EpAs e 151 controles. Foram coletadas amostras de sangue periférico, o DNA foi extraído pelo método *salting-out* e a genotipagem do polimorfismo de *IL8* realizada pelo método RFLP. Após a obtenção dos genótipos, analisou-se o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, a frequência desse polimorfismo e a associação das citocina com as EpA através do programa *OpenEpi* e o software SNPStats. Observou-se que o polimorfismo genético na espondilite anquilosante não foi estatisticamente significativa, evidenciando assim que os genótipos, onde a expressão está aumentada, não auxilia no desenvolvimento da patologia em estudo.

### Introdução

O conceito das espondiloartropatias (EpA) foi estabelecido considerando-se o englobamento de algumas doenças consideradas distintas entre si, porém, com diversas características em comum, em um mesmo conjunto. Dentre essas características comuns, estão aspectos clínicos, como a dor axial inflamatória associada à artrite, a qual é predominante em grandes articulações de membros inferiores, entesopatias periféricas, achados radiológicos como sacroileíte e achados laboratoriais como soronegatividade para o fator reumatoide, além de predisposição genética dos indivíduos a essas doenças. Estão inclusas nas EpAs: Espondilite Anquilosante (EA), Artrite Psoriásica (AP), Artrite Reativa (AR), artrite relacionada com a doença inflamatória intestinal e EpA indiferenciada (EI) (BARROS et al., 2007).

O mecanismo e a patogênese das EpAs e das doenças reumatológicas ainda não são totalmente compreendidos, de modo que esta é considerada complexa e multifatorial e envolve a atividade de citocinas pró-inflamatórias como a IL-8 que é uma citocina quimiotática que possui atuação clássica em relação à alta seletividade para neutrófilos e media a ativação e migração destes. Ela é produzida por fagócitos mononucleares e por uma variedade de células dos tecidos em estimulação por endotoxinas bacterianas, por interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) (BAGGIOLINI et al., 1998).

A expressão de interleucinas é rigidamente controlada, uma vez que a superprodução sistêmica ativa respostas inflamatórias que tendem à cronificação e lesão com dano tecidual generalizado (ABBAS et al., 2015). Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são caracterizados pela troca de uma base nitrogenada por outra na sequência do DNA. Os SNPs mais estudados da *IL8* são: *IL8* -353(T/A) (rs4073), *IL8* -738 (T/A) e *IL8* -845 (T/C) (rs2227532), os quais podem ser importantes na produção dessa citocina.

### 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 *in house on salting-out*.

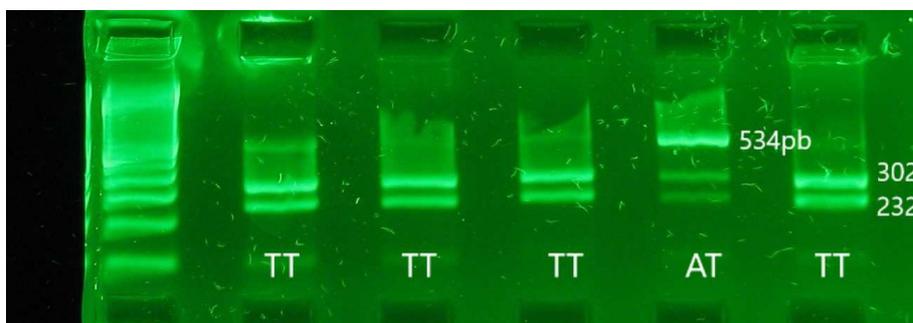
Foram avaliados os polimorfismos *IL8* -353(T/A) (rs4073), *IL8* -738 (T/A) e *IL8* -845 (T/C) (rs2227532) pelo método de PCR- RFLP, no qual utilizam-se enzimas de restrição que cortam o DNA em pontos específicos gerando fragmentos diferentes que são separados por eletroforese e visualizados em forma de bandas no gel de agarose, sendo isso realizado após a amplificação das sequências por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por metodologia já padronizada no laboratório. Para a amplificação das sequências por PCR foram utilizadas de 100ng do DNA extraído.

**Tabela 1.** Sequências dos primers e enzimas de restrição a serem utilizados para os SNPs do gene *IL8*.

SNP de <i>IL8</i>	Sequências dos primers	Enzima de restrição
-353(T/A) (rs4073)	S – 5-GAATTCAGTAACCCAGGCAT-3 R – 5-AAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC-3	Mfel
-738 (T/A) (rs ***)	S – 5-AACCCAGCAGCTCCAGTG-3 R – 5-AGATAAGCCCAGCCAATCATT-3	Xbal
-845 (T/C) (rs2227532)	S – 5-GAATTCAGTAACCCAGGCAT-3 R – 5-AAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC-3	AseI

\*\*\* Não foi encontrado o rs (sequência referência) com o número de identificação para esse SNP.

**Figura 01.** Exemplo de Genotipagem da *IL8* (SNP-738)



As frequências alélicas e genotípicas 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-se o programa *SNPStats* (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php>).

### Resultados e Discussão

Os dados obtidos estão demonstrados na tabela 2. De modo geral, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre o genótipo comparando-o aos controles; além disso, os 3 SNPs não apresentaram associação significativa entre os genótipos e a chance de desenvolver a doença.

**Tabela 02.** Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos da *IL8* em pacientes com espondiloartrites e controles.

Genótipos e alelos	Pacientes EpA N= 173 (%)	Espondilite Anquilosante (EA) N = 126 (%)	Artrite Psoriásica(AP) N =47(%)	Controles N= 151 (%)
<b><i>IL8-738</i></b>				
A/A	2 (1,2%)	2	0	1 (0,6%)
A/T	125 (72,2%)	88	37	96 (63,6%)
T/T	46 (26,6%)	36	10	54 (35,8%)
NA**	1	1	0	0
<b><i>IL8-353</i></b>				
A/A	40 (25,2%)	27	13	33 (22,2%)
A/T	81 (50,9%)	59	22	76 (51,4%)
T/T	38 (23,9%)	30	8	39 (26,4%)
NA**	14	10	4	3
<b><i>IL8-845</i></b>				
C/C	1 (0,6%)	1	0	0 (0%)

T/C	56 (35%)	41	15	43 (29,1%)
T/T	103 (64,40%)	75	28	105 (71,9%)
NA**	14	10	4	3

\*\*NA= falha na genotipagem da amostra

Podemos levar em consideração a grande complexidade da fisiopatologia das espondiloatropatias e da grande gama de citocinas e outros produtos inflamatórios que se correlacionam e se unem para a complexa fisiopatologia ainda não elucidada. Tais resultados podem demonstrar que o genótipo de interleucina 8 não é um fator preponderante para a fisiopatologia, mas sim um cofator que a auxilia, uma vez que os níveis séricos de *IL8* estão aumentados no líquido sinovial em pacientes com espondiloatropatias (SEITZ et al., 1992), o que conota sua importância na fisiopatologia.

### Conclusões

Constatou-se que, apesar de não ter sido encontrada uma associação estatisticamente significativa da interleucina 8 com o desenvolvimento de Espondilartropatias, tal alteração genética, associado a outros fatores conhecidos e/ou desconhecidos, poderia demonstrar importantes implicações terapêuticas, conforme estudado por SKOV et al., 2008, associando-se, dessa forma, vários mecanismos para o controle da doença e trazendo maior benefício para os pacientes.

### Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio da bolsa PIBIC a orientação da professora Dr<sup>a</sup>. Jeane Eliete Laguilha Visentainer e ao laboratório de Imunogenética da UEM.

### Referências

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. H. I. V. Imunologia celular e molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- BAGGIOLINI, M. et al. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 84. no. 4, p. 1045-1049, 1989.
- BARROS, P. et al. Consenso Brasileiro de Espondiloatropatias: Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica Diagnóstico e Tratamento – Primeira Revisão. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 47, no.4, p. 233-242, 2007.
- SKOV, L. et al. IL-8 as antibody therapeutic target in inflammatory diseases: reduction of clinical activity in palmoplantar pustulosis. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 181, no. 1, p.669-679, 2008.
- SEITZ, et al. Interleukin-8 in inflammatory rheumatic diseases: synovial fluid levels, relation to rheumatoid factors, production by mononuclear cells, and effects of gold sodium thiomalate and methotrexate. **Rheumatology International**, Switzerland, v. 12, no. 4, p. 159-164, 1992.