

QUANTIFICAÇÃO DA CITOCINA IL-10 E CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMO GENÉTICO NOS PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Allan Christian Toshikazu Wakita Furuse (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Fernanda Formaggi Lara Armi (PBF-UEM), Matheus Braga (PBF-UEM), Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientador), e-mail: jelvisentainer@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento:

21100004 Imunologia

21103003 Imunogenética

21104000 Imunologia Aplicada

Palavras-chave: IL-10, Espondilite anquilosante, Doença autoimune.

Resumo:

Espondilite anquilosante (EA) é uma doença autoimune cuja etiologia é desconhecida. Devido ao seu espectro reumático amplo e complexa base genética, muitos trabalhos buscam compreender melhor a patogênese e características clínicas da doença por meio de pesquisas de citocinas na imunopatogênese da doença. Apesar de o mecanismo da EA não ser totalmente compreendido, levantou-se a hipótese de que as citocinas estejam envolvidas na patogênese da doença. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que possui tanto papel estimulador, como supressor da resposta imunológica, dependendo do contexto que ela se encontra.

Introdução

As Espondiloartropatias (EpAs) constituem-se de um grupo heterogêneo de doenças inflamatórias imunomediadas que apresentam características clínicas comuns entre si e cuja etiologia é desconhecida. As EpAs podem se manifestar sobre diversas formas como a Espondilite Anquilosante (EA), Artrite Psoriásica (AP), Artrite Reativa (AR), artrite relacionada com a doença inflamatória intestinal (DII) e EpA indiferenciada (EI). Essas patologias possuem características em comum e outras distintas das demais artrites inflamatórias, em especial a Artrite Reumatoide (AR) (Gallinaro *et al.*, 2010). Mas, a EA possui características que as distinguem de outras doenças reumáticas, como o envolvimento articular periférico, assimétrico e com predomínio de artrite de grandes articulações, em especial dos membros inferiores, o acometimento das articulações sacroilíacas e da coluna vertebral, especialmente do segmento lombar, a extensão do processo inflamatório às enteses, a negatividade para a pesquisa do fator reumatoide (FR) pelos métodos convencionais, a ausência de nódulos reumatoides subcutâneos, a história familiar de EA, a associação com o HLA-B27 e a tendência à sobreposição clínica entre as

diversas doenças, principalmente, no que se refere às manifestações extra-articulares (Lipton e Deodhar, 2012).

Estudos anteriores têm mostrado uma produção maior de interleucina 10 (IL-10) em pacientes com espondiloartrites quando comparados com os controles (Rudwaleit *et al.*, 2001). Esta citocina anti-inflamatória desativa macrófagos e células dendríticas, sendo produzida como parte da resposta homeostática à infecção e inflamação e desempenha um papel crítico na limitação da duração e intensidade das reações imunológicas e inflamatórias (Moore *et al.*, 2001). Ela pode atuar tanto como supressora quanto como estimuladora da resposta imune, dependendo do contexto em que está presente. A produção de IL-10 é rigorosamente regulada, uma vez que níveis excessivos dessa citocina conduzem à incapacidade de controlar patógenos infecciosos, enquanto IL-10 insuficiente conduz a processos patológicos secundários a lesões teciduais (Moore *et al.*, 2001). Os mecanismos de ação da IL-10 incluem a supressão da apresentação de antígenos, bem como a inibição da produção de citocinas e mediadores inflamatórios. Uma atividade biológica chave da IL-10 é a supressão da inflamação mediada pelo fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-1 (Moore *et al.*, 2001). Sabe-se que polimorfismos localizados na região 5'-flanqueadora do gene IL10, como dois microssatélites de sequências (CA) repetitivas e mutações de um único nucleotídeo (SNP – single nucleotide polymorphism) nas posições –1082(G/A) (rs1800896) estão envolvidos na regulação da produção de IL-10 (Miteva *et al.*, 2014). Dessa forma, o objetivo deste projeto foi realizar a dosagem da IL-10 em pacientes com EA e correlacionar com polimorfismo do gene produtor da citocina, buscando compreender melhor a relação dessa citocina com a doença.

Materiais e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade estadual de Maringá (UEM) nº CAAE 27723114 e todos os participantes assinaram o termo de consentimento. Pacientes e controles: Foram avaliados 48 indivíduos, sendo 14 controles (EA ausente), e 34 pacientes com EA, de ambos os sexos, residentes em diferentes municípios do noroeste do Estado do Paraná triados em clínica de reumatologia particular e pelo ambulatório de reumatologia do Hospital Universitário de Maringá. Determinação dos níveis séricos da citocina IL-10: amostras de soro já obtidas e armazenadas em freezer -80°C foram utilizadas para determinação dos níveis séricos da citocina IL-10, com Kits de Imunoensaio Human Custom ProcartaPlex 10-Plex (Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com as recomendações do fabricante. O sinal de fluorescência foi verificado no equipamento Luminex® 200.

Resultados e Discussão

Quarenta e oito (48) indivíduos foram genotipados para o polimorfismo localizado na região 5'-flanqueadora do gene *IL10*, nas posições –1082(G/A) (rs1800896), , sendo 13 com genótipo A/A, 24 com genótipo G/A e 11 com genótipo G/G. A quantificação da IL-10 foi realizada para estes 48 indivíduos, em duplicata, seguindo o protocolo ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay, através de beads magnéticos,

estabelecendo uma curva padrão para comparar com a dosagem da IL-10 e analisada, posteriormente, no citômetro de fluxo (Luminex® 200). Os nossos resultados mostraram que a IL-10 no soro estava em níveis muito baixos tanto em pacientes como controles. A maioria dos indivíduos estavam com níveis abaixo do limite de detecção (<1,697 pg/ml). Foi possível detectar os níveis de IL-10 no soro de 3 pacientes (2 com genótipo G/A e 1 com G/G) e 5 controles (2 com genótipos G/A, 2 com G/G e 1 com A/A). Os resultados obtidos para a quantificação de IL-10 para esses pacientes podem ser observados na tabela 1. Não foi possível realizar a análise estatística dos dados devido ao número insuficiente de amostras com níveis séricos detectáveis.

Tabela 1. Concentrações de IL-10 no soro de pacientes e controles.

Grupo	Concentração*
Espondilite Anquilosante	2,49 pg/ml ± 2,65
Controles	0,58 pg/ml ± 0,17
Geral	1,25 pg/ml ± 1,75

* Média ± desvio padrão

Conclusões

Como a maioria dos indivíduos apresentaram níveis de IL-10 abaixo do limite de detecção, não foi possível correlacionar a dosagem dessa citocina nos pacientes com EA com polimorfismos do gene produtor dessa citocina. Outro método com maior sensibilidade seria necessário para realizar uma nova quantificação e correlação.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelos recursos financeiros enviados para o pagamento de bolsa de Iniciação Científica concedida ao discente deste projeto de pesquisa e ao Laboratório de Imunogenética da UEM - Processo nº 1589/2017-CSD pela compra dos reagentes.

Referências

GALLINARO, A.L. *et al.* Espondiloartrites: Análise de uma série brasileira comparada a uma grande casuística ibero-americana. **Rev Bras Reumatol**, vol.50, n.5, p.581-589, 2010.

LIPTON, S.; DEODHAR, A. The New ASAS Classification Criteria for Axial and Peripheral Spondyloarthritis, **Int J Clin Rheumatol**, v.7, p.675-682, 2012.

MITEVA, L. D. *et al.* Significance of -1082A/G polymorphism of IL10 gene for progression of colo rectal cancer and IL-10 expression. **Tumour Biol**, 35:12655-12664, 2014.



MOORE, K.W. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v.19, p. 683-765, 2001.

RUDWALEIT, M. *et al.* Low T cell production of TNFalpha and IFNgamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. **Ann Rheum Dis**, v.60, p. 36-42, 2001.