

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO rs1929992 NO GENE *IL33* EM CONTROLES E PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Amanda de Amorim Fernandes Toledo Martins¹; Leticia Cristina de Almeida Silva²; Victor Hugo de Souza³; Quirino Alves de Lima Neto⁴; e-mail: qalneto@uem.br.

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá;

²Acadêmica de Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá;

³Programa de pós-graduação em biociências e fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá;

⁴Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá;

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

Ciências biológicas – Imunologia (21100004) e imunogenética (21103003)

Palavras-chave: espondilite anquilosante, *IL33*, rs1929992.

Resumo:

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença inflamatória autoimune que afeta a coluna e as articulações, possui cronicidade que ocasiona rigidez na coluna ao longo dos anos. Por ser uma doença complexa e sem cura, muitos aspectos dela ainda são desconhecidos, mas sabe-se que até o momento o genótipo e fenótipo do paciente são importantes para o desenvolvimento dela. Esse é um estudo tipo caso-controle, utilizando 25 amostras de pacientes com EA e 25 amostras de controles, obtidas no Hospital Universitário de Maringá e na clínica de Reumatismo. As amostras foram obtidas a partir de coleta de sangue total dos indivíduos, e a extração do DNA genômico foi realizada pelo kit QIAGEN® e sua concentração foi determinada pelo NanoDrop, e as amostras armazenadas em freezer -20°C. A genotipagem foi realizada pela técnica de PCR-SSP e revelada por eletroforese em gel de agarose 2%. A análise estatística foi feita utilizando o programa SPNStats, considerando significativo $P < 0,05$. O resultado obtido mostrou que o SNP rs1929992 não foi associado à espondilite anquilosante.

Introdução

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença inflamatória autoimune que afeta principalmente a coluna e articulações, ocasionando rigidez espinal ao longo dos anos. O diagnóstico da doença é feito principalmente por radiografias, sendo, porém, uma doença de difícil diagnóstico nos estágios iniciais. O tratamento principal da EA consiste na administração de AINEs

(anti-inflamatórios não-esteroidais) que atuam impedindo a formação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas (BRAUN; SIEPER, 2007). A interleucina-33 (IL-33) é uma citocina membro da família da interleucina-1 (IL-1), e está envolvida em vários processos imunológicos, como respostas imunológicas tipo 1 e 2 (celular e humoral, respectivamente). Seu gene (*IL33*) está localizado no braço curto do cromossomo 9, em 9p24.1. Ela também possui papel importante na ativação de linfócitos Th2, produção de outras citocinas, como IL-7 e TNF- α . Ambas situações aumentam a intensidade das artrites e são alvo de pesquisas na EA (HAN et al., 2011). Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) são variações que ocorrem no material genético, onde há troca de um nucleotídeo por outro. Esses polimorfismos podem ter como resultado alterações funcionais ou na produção de citocinas, que podem alterar as respostas naturais do organismo, intensificando-as ou amenizando-as (JIMÉNEZ-MORALES, 2017). O objetivo do estudo foi analisar e comparar as frequências do polimorfismo rs1929992 no gene *IL33* em portadores de espondilite anquilosante e em indivíduos controles sem a doença.

Materiais e métodos

Esse estudo consistiu em um estudo caso-controle, com um total de 50 amostras, obtidas de pacientes provenientes da Clínica de Reumatismo, de Maringá, e também do Hospital Universitário de Maringá. Esses indivíduos consistiram em sendo 25 de pacientes com espondilite anquilosante e 25 de indivíduos sem a doença. O critério de seleção dos casos foi feito de acordo com Braga et al. (2021) e consistiu na seleção de indivíduos adultos diagnosticados com base nos critérios ASAS 2009 e ASAS 2011, indivíduos com EA confirmada e sem outras doenças concomitantes. O critério de seleção dos controles foi ausência de outras artrites, doenças crônicas e/ou processos inflamatórios. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá (UEM), nº 27723114 e todos os participantes assinaram o termo de consentimento.

As amostras foram coletadas a partir de punção de sangue venoso, armazenado em tubos contendo EDTA. A extração de DNA genômico do sangue total foi realizada pelo kit QIAGEN® com 200 μ L de sangue total, seguindo as instruções do fabricante. A concentração do DNA extraído foi determinada pelo NanoDrop® UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher; Wilmington, DE, USA). O DNA utilizado possuía concentração entre 20 e 100 ng/ μ L (sendo diluído quando em concentrações maiores).

A genotipagem foi feita pela reação em cadeia da polimerase com *primers* específicos para sequências (PCR-SSP). O procedimento consiste em dois conjuntos de reações, cada um com um *primer*: um para a amplificação da sequência contendo o alelo T e outro para o C, ambos com volume final de reação de 10 μ L. Foi utilizado os seguintes reagentes e suas concentrações finais: MgCl₂ 25 mM, PCR buffer 10x, dNTPs 10 mM, primers forward e reverse 10 mM, primer *HGH* 10 mM (controle interno de reação), Taq polimerase Invitrogen 5U/ μ L (Invitrogen Life Technologies, Grand Island,

NY). Depois foi realizada a amplificação em um termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler), com ciclos de 15 minutos a 95°C, seguidos de 30 ciclos de 30s em 95°C, um ciclo de 30s em 62°C, e depois outro de 30s em 72°C, finalizando 10 minutos a 72°C.

O resultado da amplificação foi analisado em gel de agarose à 2%, junto com um marcador de peso molecular de tamanho de 100 pares de base. O gel foi colocado em eletroforese por 10 minutos, nas configurações de 150V, 300 mA, 150W, sendo analisado e fotografado depois em um transiluminador (Quantum ST4 transilluminator).

A análise estatística foi realizada por regressão logística pelo programa SNPstats (disponível em: <https://www.snpstats.net/start.htm>), utilizando os modelos de herança e calculando também o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para outras análises de covariáveis, foi utilizado o e pelo test t de Student ou o teste do qui-quadrado pelo OpenEpi (disponível em: <http://www.openepi.com>) usando informações de cada voluntário, como idade, sexo, além da contagem dos alelos dos alelos. Considerou-se o valor de $P < 0,05$ com significância estatística.

Resultados e Discussão

Esse estudo contou com 50 indivíduos, sendo 25 pertencentes ao grupo dos controles e outros 25 ao grupo dos casos e analisou uma possível associação de um polimorfismo funcional de *IL33* com a EA em brasileiros.

Nos casos, ou indivíduos com EA, a frequência dos genótipos C/C, T/C e T/T foi, respectivamente, 20%, 44% e 36%. Já a frequência entre os controles foi, respectivamente, 20%, 36% e 44%. Braun e Sieper (2007) afirmam que a maior prevalência de EA é em homens. Sabendo disso, em nosso estudo não observamos essa diferença pois fizemos o pareamento, ou seja, tentamos igualar o número de homens e mulheres em casos e controles. Além disso, Fan et al (2014) mostram que o alelo C foi mais frequente em pacientes do que controles, não observamos diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas de T e C entre casos e controles (tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de frequências genotípicas de rs192992 T>C de *IL33* em casos e controles (modelo ajustado para efeito de idade e sexo).

Modelo	genótipo	EA ¹ (n=25)	controles (n=25)	OR (IC 95%) ²	P
Codominante	T/T	9 (36%)	11 (44%)	1.00	0.34
	T/C	11 (44%)	9 (36%)	0.67 (0.03 – 14.67)	
	C/C	5 (20%)	5 (20%)	-	
Dominante	T/T	9 (36%)	11 (44%)	1.00	0.55 ³
	T/C – C/C	16 (64%)	14 (56%)	2.03 (0.19 – 21.57)	
Recessivo	T/T – T/C	20 (80%)	20 (80%)	1.00	0.15
	C/C	5 (20%)	5 (20%)	-	
Sobredominante	T/T – C/C	14 (56%)	16 (64%)	1.00	0.80
	T/C	11 (44%)	9 (36%)	0.67 (0.03 – 14.67)	
Log-aditivo	-	-	-	2.28 (0.37 – 14.07)	0.34

- ¹ Indivíduos com espondilite anquilosante.
- ² Odds Ratio e intervalo de confiança de 95%.
- ³ Modelo escolhido como representativo por ter o menor AIC.

Nos controles, 20 (80%) pertencem ao sexo feminino e 5 (20%) ao masculino. Já nos casos, 15 (60%) fazem parte do sexo feminino e 10 (40%) ao sexo masculino. Analisando a covariável sexo, observamos que $p \geq 0.05$ e não há significância estatística, ou seja, nesse estudo, o sexo do indivíduo não tem associação com o desenvolvimento ou proteção contra a doença. Analisando a covariável idade, obtivemos uma média de 47,5 anos em casos e uma média de 37,9 anos em controles. Portanto, observamos uma diferença estatisticamente significativa entre casos e controles, estando uma maior média de idade relacionada a susceptibilidade a espondilite anquilosante ($P= 0.001$). Pode-se relacionar isso à cronicidade da doença, visto que é detectada mais facilmente quando está no estágio intermediário e/ou avançado. A análise dos casos e controles ainda mostrou que, a genotipagem estava de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (>0.05), ou seja, era um resultado esperado porque os pacientes não estão sofrendo mutações na frequência dos alelos ao longo das gerações.

Conclusões

O SNP rs1929992 de *IL33* não foi associado à Espondilite Anquilosante. Com base na quantidade de amostras, recomenda-se repetir o estudo com um número maior de participantes para confirmar esses resultados.

Agradecimentos

Agradeço ao Laboratório de Imunogenética da UEM, especialmente ao Victor Hugo de Souza e o professor Quirino Alves de Lima Neto por todo suporte e apoio. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Referências

BRAGA, M. et al. Influence of IL10 (rs1800896) Polymorphism and TNF- α , IL-10, IL-17A, and IL-17F Serum Levels in Ankylosing Spondylitis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 2502, 5 jul. 2021.

BRAUN, J.; SIEPER, J. **Ankylosing spondylitis** www.thelancet.com. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.thelancet.com>.

FAN, D. et al. Single nucleotide polymorphisms of the interleukin-33 (IL-33) gene are associated with ankylosing spondylitis in Chinese individuals: A case-control pilot study. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 43, n. 5, p. 374–379, 1 out. 2014.

GIAVINA-BIANCHI, P. Resposta imune tipo 2. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 3, p. 241–243, 2017.

HAN, G. W. et al. Serum levels of IL-33 is increased in patients with ankylosing spondylitis. **Clinical Rheumatology**, v. 30, n. 12, p. 1583–1588, dez. 2011.

JIMÉNEZ-MORALES, J. R. M. Implicaciones funcionales de los SNPs en ...español. **Gaceta Medica de Mexico**, v. 153, p. 238–50, 2017.