

O PAPEL DE VARIAÇÕES GENÉTICAS NO GENE DA INTERLEUCINA 10 EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E COMORBIDADES AUTOIMUNES DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Anna Paula de Oliveira Souza¹; Rafael Lima Guimarães²

¹Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: anna.paula.sl@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Genética – CCS – UFPE. E-mail: rafaellg@gmail.com

Sumário: A interleucina-10 é uma citocina dita anti-inflamatória mas que está envolvida na resposta imunológica promotora da insulite, causadora do Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) quando em níveis elevados; como, cerca de 75% de seus níveis séricos, são determinados geneticamente, nosso estudo teve como objetivo elucidar a relação de três polimorfismos de base única *rs1800896*, *rs3021097* (1800871) e *rs1800872*, localizados na região promotora do gene desta interleucina em pacientes com DM1 no Estado de Pernambuco, relacionando-os a frequência desta patologia e de suas comorbidades. Para a realização deste estudo foi realizada coleta de sangue periférico de pacientes com DM1 no ambulatório de pediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e de pacientes controles; as amostras foram submetidas a extração do DNA e genotipagem pela técnica de PCR em tempo real; os dados obtidos foram submetidos a análises estatística. Nenhum dos três SNPs estudados mostrou associação com desenvolvimento do DM1 e de suas comorbidades; o SNP de *rs3021097* mostrou está associado com a idade de diagnóstico, apresentando um *p-value = 0,02*; comprovando a relação da IL-10 com a resposta imune evidenciada na patogênese do DM1.

Palavras-chave: diabetes; interleucina-10; polimorfismos.

INTRODUÇÃO

O DM1 é uma patologia autoimune, órgão específica, crônica e multifatorial; mediada provavelmente pela perda da autotolerância periférica, sendo caracterizada pela destruição das células beta pancreáticas com os linfócitos T promovendo este ataque, provocando insulite, característica histopatológica do DM1, e consequente hiperglicemia; sendo a insulina o hormônio responsável pela sinalização da entrada de glicose nas células é necessário a sua reposição exógena permanentemente (OPIE, 1901; BLUESTONE et al., 2010; KAWASAKI, 2014). Estes altos níveis de glicose circulante de maneira crônica provocam disfunção em vasos com vários órgãos como olhos, rins, nervos e coração sendo atingidos, sendo também observado déficit no crescimento e susceptibilidade a infecções. (ATKINSON M.A., 2014; JAHROMI M.M., 2007; ADA, 2014). A tolerância periférica é uma característica essencial do sistema imune, sendo necessária para um correto funcionamento do organismo; a apoptose ou supressão das células T maduras por células T reguladoras são mecanismos envolvidos na promoção da tolerância periférica, onde

defeitos podem patrocinar doenças autoimunes como o DM1. A arquitetura do microambiente é de fundamental importância para o estabelecimento de uma resposta imune, onde as citocinas participam contribuindo para o tipo de resposta que será estabelecida (ABBAS A.K. et al, 2012 7ª edição). As citocinas são proteínas solúveis, produzidas por diferentes tipos celulares, pleiotrópicas e com capacidade de mediar e regular todos os aspectos das imunidades inata e adaptativa, compondo um grupo heterogêneo; a ação geralmente está limitada as regiões próximas ao local de sua síntese, mas pode apresentar ação autócrina e, se e006D grande quantidade, endócrina; a denominação das citocinas é dada de forma arbitrária, sendo classificadas por função ou como interleucina devido a, no passado, ter sua síntese e atuação, relacionada com os leucócitos. Algumas citocinas produzidas pelos linfócitos T agem em células apresentadoras de antígenos (APC's) construindo uma sinapse imunológica. A síntese das citocinas é dada por uma nova transcrição (ABBAS A.K. et al, 2012 7ª edição). A IL-10 é uma citocina pleiotrópica participante do grupo Th2, esta interleucina é uma potente mediadora anti-inflamatória por regular negativamente a resposta imune mediada por célula e a resposta inflamatória, mas também exerce contribuição na promoção da insulite, quando em altos níveis. A interferência de polimorfismos no gene da IL-10 é de fundamental importância devido ao alto poder de regulação genética na produção desta citocina (NG et al., 2013). O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1(1q) e possui vários polimorfismos na região do promotor, apresentando interferência nos níveis de produção desta citocina e conseqüentemente alteração no equilíbrio Th1/Th2 e nas respostas imunológicas, desta forma essas alterações genéticas podem influenciar na promoção do DM1 e das comorbidades associadas. A patogênese do DM1 ainda não foi completamente elucidada, mas o envolvimento de fatores ambientais e genéticos já é descrito na literatura (PUGLIESE, 2013). Várias regiões do sistema HLA foram associadas com o desenvolvimento do DM1, mas outras regiões não HLA também foram associadas ao desenvolvimento da doença, principalmente as relacionadas ao sistema imune, como o microambiente é essencial para o estabelecimento de uma resposta imune, sendo necessária a configuração de um perfil determinado com o envolvimento de citocinas específicas para o desencadeamento de respostas inflamatórias, no qual células e moléculas realizam funções o estudo deste é de fundamental importância para o esclarecimento do processo patológico do DM1 (BERGHOLDT et al., 2012). O DM1 provoca prejuízos aos pacientes, por provocar graves danos físicos e alterações no cotidiano, e ao sistema de saúde por possuir taxas de morbimortalidade consideráveis representando grandes investimentos do governo em saúde pública, proporcionando custos globais anuais bilionários. Assim, é importante o investimento em pesquisas que promovam um diagnóstico precoce dos indivíduos susceptíveis, permitindo uma intervenção profilática, conseqüentemente diminuindo a possibilidade de comorbidades associadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo utilizou amostras de 287 pacientes diagnosticados com DM1 segundo os critérios da American Diabets Association (ADA) atendidos no Hospital das Clínicas (HC) da

Universidade Federal de Pernambuco, entre o período de março de 2010 a dezembro de 2013 e 295 indivíduos saudáveis e sem histórico familiar de doença autoimune, para compor o grupo controle. Todos foram recrutados voluntariamente, após a explicação da pesquisa e assinatura do termo livre esclarecido. O diagnóstico para a DC e AITD foi realizado através de anticorpos específicos. O grupo de pacientes para as análises foram divididos em T1D/AITD, T1D/DC e T1D/AITD/CD. O DNA foi extraído das amostras de sangue periférico anti-coagulado com EDTA usando o protocolo de mini salting out no Laboratório de Imunopatologia KeizoAsami e a qualidade do DNA foi avaliada por quantificação no NanoDrop. Os SNPs-819 C/T (rs3021097), -592 A/C (rs1800872) e -1082 A/G (rs1800896) foram analisados através da plataforma 7500 Real Time PCR Applied Biosystem sem tempo real com sondas alelo específicas (C_1747362_10, C_1747363_10 and C_1747360_10) (TaqMan® da Applied Biosystems). O poder das análises foi verificado pelo teste G*power, versão 3.1 com probabilidade de erro de 0.05. As frequências genóticas e alélicas foram calculadas pelo SNPStats. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo software GenotypeTransposer, a análise dos SNPs e a idade de início do DM1 utilizou o programa R, versão 2.12.2. O desequilíbrio de ligação e haplótipos foram avaliados através do Haploview. A Odds Ratio (OR) e o intervalo de confiança (CI) também foram calculados. Realizou-se também o teste de correção de Bonferroni's e $p\text{-value} < 0.025$ foi considerado com significância estatística. A relevância estatística de todas as comparações foi analisada pelo Teste de Fisher.

RESULTADOS

As análises realizadas comprovaram que não foi encontrada diferença estatística entre o grupo de pacientes e controle, para as mutações estudadas; sendo verificada a associação entre o SNP rs3021097 e o diagnóstico mais retardado do DM1 ($p\text{-valor}: 0,025$).

DISCUSSÃO

Os SNPs estudados apesar da localização no promotor do gene da IL-10, uma região com influência nos níveis de produção da citocina não foi encontrada associação com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do DM1 e de suas comorbidades, $p\text{-value} > 0,05$, na população pernambucana; dado também encontrado em outras populações; mesmo sendo bem descrito na literatura a relação entre os níveis desta interleucina e o desenvolvimento de insulite (TEGOSHI et al (2002), MOHEBBATIKALJAH et al, (2009); Urcelay et al, 2004; Reyner et al, 2006). A associação do SNP de rs3021097 com a idade do diagnóstico, onde este apresentou um retardamento na idade do diagnóstico ($p\text{-valor}: 0,025$), propõe um papel de proteção do desenvolvimento de DM1 em indivíduos que apresentem o genótipo C/C quando comparados a indivíduos T/T, conferindo um retardamento de até dois anos no desenvolvimento do DM1, assim o genótipo protetor pode estar associado ao grau de dano ao tecido pancreático durante a resposta inflamatória no processo de autoimunidade, na patologia. As análises também mostraram que os SNPs estão em equilíbrio de ligação ($D' = 0,99$) o que comprova que sua segregação e combinação são aleatórias.

CONCLUSÕES

O presente estudo mostra que os SNPs estudados não conferem uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do DM1 na população pernambucana, mas que mais estudos que envolvam a expressão da IL-10 em pacientes com DM1, assim como também o estudo dos níveis séricos da citocina, precisam ser realizados para elucidação do seu papel na patogênese do DM1.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos fomentadores da pesquisa CNPQ, CAPES e FACEPE pelo financiamento; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, ao meu orientador Professor Dr. Rafael Lima Guimarães, a Dr^a Jaqueline Azevedo Silva por sua presença e orientação ao longo de todo desenvolvimento do trabalho e aos meus colegas de laboratório.

REFERÊNCIAS

ABBAS A.K. et al, 2012 7^a edição

ATKINSON, M. A; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. *Lancet*, v. 383, n. 9911, p. 69–82, 2014. **Elsevier** Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890997>>. Acesso em: 01/09/2015

Bluestone JÁ, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical intervention in type 1 diabetes. **Nature** 2010 Apr

IDE, A.; KAWASAKI, E.; ABIRU, N.; et al. Genetic association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. **Human Immunology**, v. 63, n. 8, p. 690–695, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885902004172>>

Jahromi MM, Eisenbarth GS. Cellular and molecular pathogenesis of Type 1A diabetes. **Cell Mol Life Sci**. 2007 Apr.

Ng, T.H.S. et al., Interleukin-10 regulates adaptive immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 4, artigo 129, maio 2013.

MOHEBBATIKALJAH, H.; MENEVSE, S.; YETKIN, I.; DEMIRCI, H. Study of interleukin-10 promoter region polymorphisms (–1082A/G, –819T/C and –592A/C) in type 1 diabetes mellitus in Turkish population. **Journal of Genetics**, v. 88, n. 2, p. 245–248, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12041-009-0034-x>>.