

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES INFLAMATÓRIOS NAS ALTERAÇÕES DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Isabela Cristina Cordeiro Farias¹; Marcos André Cavalcanti Bezerra²

¹Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: isabela.c.farias@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Biofísica – CCB – UFPE. E-mail: macbezerraufpe@gmail.com

Sumário: O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das complicações da anemia falciforme (AF) que causa maior morbimortalidade, podendo acometer 25% dos portadores da doença. A AF, por apresentar vaso-oclusões recorrentes e consequente ativação do endotélio vascular, induz uma resposta inflamatória contínua, caracterizada por níveis elevados de mediadores inflamatórios. Estudos demonstram que a ativação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias podem estar relacionadas ao desenvolvimento e evolução do AVC, caracterizando os polimorfismos em genes inflamatórios como possíveis moduladores desse evento clínico. Dentre os genes polimórficos possivelmente implicados na patogênese do AVC estão o *IL1RN*, *IL6* e o *IL10*. O objetivo desse trabalho foi avaliar a associação dos polimorfismos nos genes *IL1RN*, *IL6* (rs1800795) e *IL10* (rs1800896), relacionados à inflamação, com a susceptibilidade à ocorrência da doença cerebrovascular em pacientes com anemia falciforme. Foram incluídos 271 pacientes com AF, classificados de acordo com o desenvolvimento da doença cerebrovascular. Destes, 71 com AVC confirmado, definindo o grupo-caso. Como controles, foram estudados 140 pacientes maiores de 18 anos, que não apresentaram evidências sintomáticas de lesão neurológica, além de exame de imagem confirmando a ausência. Por fim, 60 pacientes apresentaram um exame de imagem alterado, mas sem desenvolvimento do AVC, definindo o grupo de faixa de risco para o AVC. A pesquisa do polimorfismo VNTR no gene da *IL1RN* foi realizada por PCR, seguida da análise de repetições, e a detecção dos polimorfismos *IL10* -1082 G/A (rs1800896) e *IL6* G-174C (rs1800795) foi realizada por PCR em tempo real (qPCR). As análises estatísticas foram feitas pelo teste exato de Fisher e teste de Qui-quadrado utilizando o software SPSS 19.0. Os nossos resultados demonstraram que os polimorfismos *IL6* G-174C (rs1800795) e *IL10* -1082 G/A (rs1800896) não apresentaram nenhum resultado estatisticamente significativo quando comparado os três grupos de maneira independente ($p=0,3559$ e $p=0,5897$, respectivamente), e quando a análise foi realizada envolvendo apenas dois grupos (Caso + Faixa de Risco x Controle) ($p = 0,3254$ e $p = 0,6806$, respectivamente). Em relação ao polimorfismo VNTR do *IL1RN*, nenhum resultado estatisticamente significativo foi encontrado quando comparado os três grupos separadamente ($p=0,9280$) e nem quando a análise foi realizada envolvendo apenas dois grupos ($p=0,7993$). Concluímos então em nosso estudo, que os polimorfismos estudados parecem não estar associados com a susceptibilidade ao desenvolvimento do AVC em nossa amostra de pacientes com AF.

Palavras-chave: anemia falciforme; avc; fatores genéticos.

INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva de distribuição mundial, causada por uma mutação pontual no gene da globina β (HBB), que promove a substituição do ácido glutâmico pela valina na 6^a posição do gene da cadeia β globínica, levando a formação de uma hemoglobina anormal (HbS). Em condições especiais, como

baixas concentrações de oxigênio, diminuição do pH, baixas concentrações de hemoglobina fetal (HbF) e hemoglobina A₂ (HbA₂), a HbS sofre uma polimerização, formando estruturas filamentosas que se depositam nas hemácias, modificando sua forma e tornando-as falciformes (NAGEL & PLATT, 2001; STUART & NAGEL, 2004). Devido a sua mudança estrutural, esses eritrócitos promovem eventos hemolíticos e vaso-oclusivos, caracterizando os principais fenótipos da AF (STEINBERG, 2008). O AVC pode ser definido como um evento neurológico agudo secundário à oclusão de uma artéria ou a uma hemorragia, com conseqüente isquemia e/ou sinais e sintomas neurológicos. Pelo fato da AF por ser um processo inflamatório crônico, isso promove uma maior adesão das hemácias falcizadas ao endotélio, além da inflamação gerada pela lesão de reperfusão. Estes efeitos levam a produção de citocinas, promovendo uma disfunção endotelial, aumento de mediadores inflamatórios, adesivos e trombóticos, além de inibir a produção de mediadores citoprotetores, como o óxido nítrico (PHELAN & FALLER, 1996; SOLOVEY et al., 1997). A ativação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode estar relacionada ao desenvolvimento e evolução do AVC, caracterizando os polimorfismos em genes inflamatórios como possíveis moduladores desse evento clínico. (MAROUSI et al., 2011; PARK et al., 2011). Dentre os genes polimórficos possivelmente implicados na patogênese do AVC está o antagonista ao receptor de interleucina 1 (*IL-1RN*), citocina anti-inflamatória que se liga ao receptor tipo I das células endoteliais protegendo-as contra a apoptose induzida pela IL-1 β , caracterizando o *IL-1RN* como um possível alvo terapêutico contra as desordens inflamatórias. A interleucina 6 (IL-6), citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, é uma proteína multifuncional responsável principalmente pela manutenção da resposta inflamatória e presente no processo que modula a fase aguda do AVC. A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória secretada por linfócitos e monócitos responsável por contrabalancear os efeitos do TNF- α e outras moléculas pró-inflamatórias. Devido ao grave risco e alta incidência do AVC na AF, aumenta-se a necessidade de testes prognósticos que possam identificar precocemente pacientes que apresentam alto risco de desenvolver o AVC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística: Foram analisados 270 pacientes portadores anemia falciforme acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE, que de acordo com o desenvolvimento da doença cerebrovascular, foram classificados em três grupos: Grupo Caso: 71 pacientes que apresentam registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica e/ou pacientes que apresentam evidentes manifestações e queixas clínicas decorrentes de acidente vascular cerebral; Grupo Risco: 59 pacientes que apresentam Doppler Transcraniano alterado (velocidade de fluxo \geq 170 cm/s), porém, ainda não tenham desenvolvido o AVC; Grupo Controle: 140 pacientes acima de 18 anos que não apresentam evidências sintomáticas de lesão neurológica, além de um exame de imagem confirmando essa ausência.

Desenho do estudo: O estudo foi do tipo corte transversal analítico realizado no período de agosto 2014 a julho 2015.

Análise Clínica: Os dados clínicos foram obtidos pela análise de prontuários dos pacientes que comparecem regularmente ao ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE, onde esses dados são atualizados a cada visita de rotina.

Análise Molecular: A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificado (Davis *et al.*, 1986). A amplificação do material genético foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), *in vitro*, para amplificação de DNA. A reação, catalisada pela *Taq* DNA polimerase, utiliza

primers que se hibridizam em fitas opostas de regiões específicas do genoma e flanqueiam a sequência a ser amplificada. Os ciclos são séries repetidas de desnaturação do DNA, anelamento e extensão dos *primers*, resultando em um acúmulo exponencial do fragmento (SAIKI, 1992). O PCR em tempo real (qPCR) utilizando o sistema TAQMAN®, consiste de sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para serem complementares à cadeia de oligonucleotídeos.

Análise Estatística: Após as análises dos dados moleculares, as informações foram submetidas à análise estatística, realizada pelo teste exato de Fisher e teste de Qui-quadrado, com o suporte do software SPSS 19.0. O resultado foi considerado significativo quando se obteve um $p < 0,05$.

RESULTADOS

IL1RN VNTR

As populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em relação ao polimorfismo *IL1RN VNTR*, nenhum resultado estatisticamente significativo (p value Qui-quadrado = 0,9280) foi encontrado quando comparado a nossa população de pacientes de acordo com o desenvolvimento do AVC. Foram analisados os alelos mais frequentes: 4R/4R (Caso: 65%; Risco: 53% e Controle: 125%) e 4R/2R + 2R/ 2R (Caso: 4%; Risco 3% e Controle: 9%)

Em relação à análise envolvendo apenas dois grupos (Caso + Faixa de Risco x Controle), não foram encontrados resultados estatisticamente significantes (p value Fisher = 0,7993).

IL6 -174 G/C (rs1800795)

As populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. No polimorfismo *IL6 -174 G/C (rs1800795)*, nenhum resultado estatisticamente significativo (p value Qui-quadrado = 0,3912) foi encontrado quando comparado a nossa população de pacientes de acordo com o desenvolvimento do AVC.

Em relação à análise envolvendo apenas dois grupos (Caso + Faixa de Risco x Controle), não foram encontrados resultados estatisticamente significantes (p value Fisher = 0,3254).

IL10 -1082 G/A (rs1800896)

As populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em relação ao polimorfismo *IL10 -1082 G/A (rs1800896)*, nenhum resultado estatisticamente significativo (p value Qui-quadrado = 0,5897) foi encontrado quando comparado a nossa população de pacientes de acordo com o desenvolvimento do AVC. De modo semelhante, não foram obtidos resultados estatisticamente significantes quando comparada as frequências alélicas (p value Fisher = 0,8087).

Em relação à análise envolvendo apenas dois grupos (Caso + Faixa de Risco X Controle), não foram encontrados resultados estatisticamente significantes (p value Fisher = 0,6806). De modo semelhante, não foram obtidos resultados estatisticamente significantes quando comparada as frequências alélicas ($p = 0,989$).

DISCUSSÃO

Witkin e cols. (2002) relacionaram o polimorfismo VNTR *IL1RN* e algumas doenças que predis põem à inflamação, como doenças autoimunes, demonstrando o *IL1RN*2* como sendo o genótipo com uma resposta inflamatória mais prolongada e severa que os outros genótipos. Por outro lado, Tong e cols. (2011), encontraram associação entre o alelo 2 (2R) e a proteção para o AVCI em uma população chinesa, de um determinado

grupo étnico (han). O efeito protetor ou de risco do polimorfismo *IL1RN* VNTR para o AVC não foi confirmado em nosso estudo, o que pode ser explicado pela elevada heterogeneidade genética da população brasileira.

O dano constante causado pelas hemácias falcizadas ao endotélio vascular promove o aumento de mediadores inflamatórios em pacientes com AF, podendo levar a oclusão de vasos (BANDEIRA et al., 2013). A IL-6, um desses mediadores, além de induzir a vasoclusão, promove uma resposta pró-inflamatória aguda pós-isquêmica, com estimulação na síntese de proteínas de fase aguda, que contribuem com um ciclo inflamatório crônico (FULLER & ZHANG, 2001). Flex e cols. (2004) em estudo com italianos, associaram o polimorfismo no gene codificante da IL-6 e moléculas inflamatórias (ICAM-1, E-sel), de forma independente, com a predisposição ao AVC. Porém, em nosso estudo não encontramos nenhuma associação entre o polimorfismo no gene *IL6* -174 (rs1800795) com o risco para o AVC, semelhante ao estudo de Balding e cols. (2004).

A diminuição dos níveis de IL-10, originada pelo alelo A, pode favorecer o desenvolvimento do AVC em populações não falciformes (MUNSHI et al., 2010; SULTANA et al., 2011), sugerindo, assim, um papel neuroprotetor da IL-10 (TUTTOLOMONDO et al., 2012). Entretanto, em nosso estudo, nenhuma associação foi encontrada entre o polimorfismo *IL10* -1082 G/A (rs1800896) e o desenvolvimento do AVC em nossa população de pacientes com AF, resultado semelhante ao encontrado por Marousi e cols. (2011) e Trompet e cols. (2007), ao avaliarem pacientes saudáveis.

Apesar da anemia falciforme já ser reconhecida como uma doença que apresenta um quadro inflamatório crônico (STEINBERG, 2006), os efeitos das moléculas inflamatórias na doença ainda são pouco esclarecidos (LANARO et al., 2009). Sendo assim, novas avaliações sobre as moléculas inflamatórias e anti-inflamatórias e suas variações genéticas, como o haplótipo do gene *IL10*, ainda são necessárias.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que em nosso estudo, os polimorfismos estudados: *IL-1RN* VNTR, *IL10* -1082 G/A (rs1800896) e *IL6* -174 G/C (rs1800795) parecem não estar associados com a susceptibilidade ao desenvolvimento do AVC em nossa amostra de pacientes com AF.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação Hemope, por disponibilizar o Banco de DNA do laboratório de hemoglobinopatias e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

- Balding, J., Livingstone, W.J., Pittock, S.J., Mynett-Johnson, L., Ahern, T., Hodgson, A., Smith, O.P. 2004. The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischaemic stroke in patients without a history of hypertension. *Irish Journal of Medical Science* 173(4):200-3.
- Davis, L.G., Dibner, M.D., Battey, J.F. 1986. *Basic Method in Molecular Biology*. 1ª ed. Londres: Elsevier, 388p.
- Steinberg, M.H. 2008. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Scientific World Journal*, 8: 1295-34.
- Trompet, S., Pons, D., De Craen, A.J., Slagboom, P., Shepherd, J., Blauw, G.J., Murphy, M.B., Cobbee, S.M., Bollen, E.L., Buckely, B.M., et al. 2007. Genetic variation in the interleukin-10 gene promoter and risk of coronary and cerebrovascular events: the PROSPER study. *Annals of New York Academy of Science*, 1100:189-98.