

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -819C>T NO GENE *IL10* E A HANSENÍASE NA POPULAÇÃO ALAGOANA

Heloisa de Almeida Freitas^{1*}, Susana Paiva Oliveira², Luana Karen C. dos Santos², Karen da Costa Paixão³, José Victor de M. Silva³, Mikael Adalberto dos Santos⁴, Everly Santos Menezes⁴, Carolinne de Sales Marques⁵

1. Graduanda do Curso de Ciências Biológicas - Licenciatura da Universidade Federal de Alagoas – Campus de Arapiraca (UFAL)
2. Mestrando(a) pelo Programa de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
3. Graduando(a) do Curso de Medicina – Bacharelado da Universidade Federal de Alagoas – Campus de Arapiraca (UFAL)
4. Graduado(a) da Faculdade de Enfermagem – Bacharelado da Universidade Federal de Alagoas – Campus de Arapiraca (UFAL)
5. Pós Doutora e Professora da Universidade Federal de Alagoas – Campus de Arapiraca (UFAL) - Curso de Medicina - Bacharelado /Orientadora

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pela bacilo *Mycobacterium leprae*. No estado de Alagoas em 2017, sua taxa de incidência foi de 8,89/100 mil hab. O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação do SNP -819C>T no gene da IL-10 com hanseníase na população do agreste de Alagoas. Foi realizado um estudo caso-controle, utilizando amostras de casos e controles, recrutadas em Arapiraca-AL. Realizou-se a genotipagem do SNP. As análises de associação com a hanseníase foram feitas utilizando a OR como medida de associação. Incluiu-se 103 amostras de pacientes e 180 amostras de controles. O SNP *rs1800871-IL10*, troca C>T na posição -819, apresentou frequência para o alelo T de 35% em controles, e de 38% em pacientes, e as análises de associação mostraram que o marcador não foi associado com a hanseníase (OR= 1,16, p-valor= 0,86). Dessa forma, o SNP -819C>T, apresentou os resultados indicaram ausência de associação do marcador com a hanseníase com a população do agreste alagoano.

Autorização legal: O projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com número de protocolo 068649/2016, parecer de aprovação nº 1.899.677, como parte de um projeto maior intitulado “Fatores de susceptibilidade à hanseníase em Alagoas: aspectos epidemiológicos, genéticos e imuno-inflamatórios”.

Palavras-chave: Polimorfismo, Caso-controle, Epidemiologia.

Apoio financeiro: CNPq, UFAL, FAPEAL.

Introdução

A hanseníase é uma doença infecciosa milenar, porém ainda é considerada um problema de saúde pública no Brasil. É causada pela bactéria *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente os nervos periféricos e os macrófagos de pele, podendo levar a incapacidades nos pacientes (SOUZA et. al., 2019). Em 2018, no Brasil foram registrados 28.660 novos casos da doença, com uma taxa de detecção de novos casos de 13,68 por 100.000 habitantes, perdendo apenas para a Índia, com 120.334 novos casos (WHO, 2019). No estado de Alagoas no ano de 2017, foram notificados 288 casos novos da doença, que representa uma taxa de detecção de 8,89/100 mil hab., considerada de média a alta endemicidade (DATASUS, 2019).

Dentre os indivíduos expostos ao *M. leprae*, apenas uma pequena proporção irá manifestar a doença, podendo essa susceptibilidade ser caracterizada através da interação patógeno-hospedeiro sendo influenciada por fatores genéticos e não genéticos. Assim, fatores genéticos do hospedeiro, principalmente polimorfismos de base única (SNP), são considerados fatores de risco para susceptibilidade a hanseníase, podendo ser transmitidos para gerações futuras através dos genes (SINGH et. al., 2018; SALES-MARQUES et. al., 2017). A interleucina-10 (IL-10) tem sua secreção regulada por diversas citocinas, considerado um regulador inflamatório, podendo provocar lesões teciduais devido a presença de doenças crônicas como a hanseníase (CYKTOR; TURNER, 2011). O SNP -819C>T (*rs1800871*) na região promotora do gene da IL-10 está associado com a ocorrência da hanseníase em várias populações, porém, ainda não foi investigado na população Alagoana.

O objetivo desse estudo foi avaliar a associação do SNP -819C>T no gene da IL-10 com hanseníase na população do agreste de Alagoas. Consequentemente foi realizada a quantificação das amostras de DNA dos controles e pacientes e a avaliação da integridade dos mesmos, conduzida uma genotipagem do polimorfismo -819C>T no gene *IL10* em casos e controles e avaliar a associação com a hanseníase.

Metodologia

População de estudo e auxílio na coleta de amostras

A pesquisa foi realizada no município de Arapiraca, estado de Alagoas, Brasil. O recrutamento baseou-se na formação de grupos de indivíduos com hanseníase (casos) e indivíduos saudáveis (controles). O

recrutamento de pacientes foi realizado no Centro de Referência Integrado de Arapiraca (CRIA), um centro considerado uma entidade de diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com hanseníase no município de Arapiraca. O recrutamento para composição do grupo controle foi realizado no Hemocentro Regional de Arapiraca (HEMOAR). A coleta de amostras (sangue total periférico) em ambos os grupos foi realizada através de punção venosa, em um tubo de coleta a vácuo de 4mL para extração de DNA. A etapa experimental foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica da UFAL – Arapiraca (LABMEG).

Processamento e Acondicionamento das amostras

Os tubos foram transportados, devidamente identificados (iniciais do nome do participante, sexo, data de coleta, data de nascimento, local da coleta e número de identificação de paciente ou controle), e conservados em um suporte de gelo para preservação da amostra. Após a coleta, os tubos com amostras para a extração de DNA foram invertidos, evitando a coagulação do sangue periférico, e armazenados em freezer a -20° C.

Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue coletadas foi realizada através do protocolo de extração *salting out* (ou método de precipitação do DNA por NaCl/Etanol/Proteinase k), utilizando de adaptações para desempenho melhorado.

Controle de qualidade do DNA

Foi verificada quantidade do DNA extraído através da espectrofotometria do espectrofotômetro BioPhotometer Plus (eppendorf AG, Hamburg, Germany), utilizando os parâmetros 280/260 e 260/230 para inferir a qualidade do DNA.

Genotipagem

Com o DNA extraído foi realizada a genotipagem por discriminação alélica através do PCR em tempo real, utilizando ensaio tipo Taqman, e seguindo o protocolo do fabricante (Applied Biosystems). O SNP investigado foi -819 C>T (rs1800871), localizado na posição -819 do gene *IL10*. Para a genotipagem as amostras de DNA foram diluídas para estar em concentração de 10- 50 ng/ μ L e as reações realizadas no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems). Os gráficos de discriminação alélica foram gerados pelo *software* StepOne Plus do mesmo fabricante.

Análises Estatísticas

As análises serão realizadas através do SNPStats (<https://www.snpstats.net/preproc.php>), uma ferramenta online para análise de SNPs. Foram obtidas as frequências dos alelos e dos genótipos do SNP *rs4942254* nos controles e casos, as quais foram verificadas quanto ao desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A estimativa de associação genética entre SNP e a hanseníase irá se basear na comparação das frequências entre casos e controles. As estimativas serão realizadas através da OR (*Odds Ratio*) e seus respectivos valores de *p* e intervalo de confiança a 95%.

Resultados e Discussão

O presente estudo incluiu pacientes diagnosticados com hanseníase em Alagoas, bem como, indivíduos saudáveis para a realização de um estudo do tipo caso-controle de associação genética. Durante a pesquisa foram coletadas 103 amostras de pacientes com hanseníase (grupo de casos), e 180 indivíduos sem hanseníase (controles). Na população recrutada, a doença se distribuiu em uma ampla faixa etária, a média de idade foi de 51 anos. Houve uma concentração de 59% dos casos em homens e 41% em mulheres, sendo tanto de Arapiraca quanto de municípios circunvizinhos. Em relação ao grupo controle, foram recrutados 180 indivíduos, com idade média de 40 anos, com 68% do grupo composto de homens e 32% por mulheres.

Para o polimorfismo -819C>T no gene *IL10*, foi observada uma frequência de 36% na população total para o Alelo T, sendo de 35% a frequência do mesmo nos controles, amostra representativa da população e Alagoas (**Tabela 1**). Outro estudo que também destacou frequência superior do alelo C em relação ao T foi feito em uma região endêmica no noroeste do México (FÉLIX, et. al., 2011).

Em relação aos genótipos, nos controles a maior frequência foi observada para os indivíduos heterozigotos CT (47%), enquanto que a menor foi dos indivíduos TT (12%). As frequências genotípicas mostraram ligeira diferença entre pacientes e controles considerando os heterozigotos (50% vs. 47,5%). Quando testadas em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, as distribuições de frequências não desviaram do esperado, resultando em *p*-valores não significativos no qui-quadrado (**Tabela 1**). Frequências que desviem desse equilíbrio poderiam indicar erros metodológicos ou viés de recrutamento amostral, demonstrando a qualidade do nosso desenho experimental.

Tabela 1 - Frequência alélica e genotípica do SNP rs1800871 no gene *IL10* em casos e controles da população alagoana.

	Total (Frequência %) N= 257	Controles (Frequência %) N= 168	Casos (Frequência %) N= 97
Alelos			
C	328 (0,64)	208 (0,65)	120 (0,62)
T	186 (0,36)	114 (0,35)	72 (0,38)
Genótipos			
CC	102 (0,40)	66 (0,31)	36 (0,38)
CT	124 (0,48)	76 (0,51)	48 (0,50)
TT	31 (0,12)	19 (0,18)	12 (0,12)
NA	26	19	7
Teste para Equilíbrio de Hardy-Weiberg	P= 0,50	P= 0,73	P= 0,66

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Nas análises de associação (**Tabela 2**) foram observados valores de OR próximos de 1, e valores de p estatisticamente não significativos para todos os modelos genéticos avaliados (OR: 1,16; p-valor: 0,86, modelo codominante). Após o ajuste aplicado aos valores de OR, incluindo o sexo como co-variável, também não houve diferença significativa na frequência do SNP entre casos e controles, indicando não haver associação com a hanseníase. Em um estudo realizado no Norte da Índia, a frequência do -819C>T também não demonstrou significância entre os pacientes e controles com relação aos genótipos -819CT (TARIQUE, et. al., 2015). Em uma meta-análise, foi evidenciada a existência de associação entre o -819C>T e a hanseníase nas populações do Rio de Janeiro e Minas Gerais, mesmo acrescentando dois novos grupos familiares que não mostraram significância (ALVARADO-ARNEZ, et. al., 2015).

Tabela 2 – Frequência do SNP rs1800871 no gene *IL10* em casos e controles e a associação com a hanseníase.

		N (Frequência %)		OR sem ajuste (IC a 95%*)	P-valor	OR com ajuste * (IC 95%)	P-valor
		Controles	Casos				
<i>rs1800871-IL10</i>							
Codominante	C/C	66 (41)	48 (50)	1,00		1,00	
	C/T	76 (47,2)	12 (12,5)	1,16 (0,67-1,99)	0,86	0,88 (0,53-1,50)	0,89
	T/T	19 (11,8)	36 (37,5)	1,16 (0,51-2,65)		0,95 (0,41-2,21)	
Dominante	C/C	66 (41)	36 (37,5)	1,00		1,00	0,66
	C/C – C/T	95 (59)	60 (62,5)	1,16 (0,69-1,95)	0,58	0,89 (0,53-1,50)	
Recessivo	T/T	142 (88,2)	84 (87,5)	1,00	0,87	1,00	0,96
	C/C – C/T	19 (11,8)	12 (12,5)	1,07 (0,49-2,31)		1,02 (0,46-2,25)	
Sobredominante	C/C – T/T	85 (52,8)	48 (50)	1,00	0,66	1,00	0,64
	C/T	76 (47,2)	48 (50)	1,12 (0,67-1,85)		0,89 (0,53-1,47)	
Log-additive	***	***	***	1,10 (0,75-1,61)	0,62	0,94 (0,64-1,38)	0,76

*IC-Intervalo de confiança=à 95%; **OR ajustada para sexo; *** Não se aplica.

Dados da pesquisa, 2019.

Conclusões

Os resultados mostraram que o SNP -819 C>T no gene *IL10* apresentou frequência de 35% para o alelo T (alelo minoritário), e de 48% para os heterozigotos CT, sendo de frequência importante na população alagoana. O SNP -819 C>T não foi associado com a hanseníase, ou seja, a população alagoana não está predisposta a

maior risco ou proteção à doença em relação ao SNP estudado. Porém ao decorrer do desenvolvimento futuro da pesquisa, com um maior tamanho experimental, os resultados podem se diferenciar.

Este estudo contribui para pesquisas futuras relacionadas a identificação de marcadores genéticos associados com a hanseníase na região, visando contribuir com a identificação de marcadores de susceptibilidade para a hanseníase no Brasil.

Referências bibliográficas

ALVARADO-ARNEZ, L. E. et al. Associação de polimorfismos de IL10 e hanseníase: uma meta-análise. **PloS um**, v. 10, n. 9, p. e0136282, 2015.

CYKTOR, Joshua C.; TURNER, Joanne. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. **Infection and immunity**, v. 79, n. 8, p. 2964-2973, 2011.

DATASUS. Hanseníase. Alagoas (2017). **Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase, por ano diagnóstico - Municípios/UF/Regiões/Brasil - 2017, 03 out. 2018. DOI**
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/dhdat.exe?hansenise/hantfal17.def>. Disponível em: 2018. Acesso em: 08 jan. 2020.

FÉLIX, J. S. V. et al. Lack of effects of the TNF-a and IL-10 gene polymorphisms in Mexican patients with lepromatous leprosy. 2012.

SALES-MARQUES, Carolinne et al. Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005754, 2017.

SINGH, Iitu et al. VDR polymorphism, gene expression and vitamin D levels in leprosy patients from North Indian population. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006823, 2018.

SOUZA, L. R. et al. HANSENÍASE: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO. **HUMANIDADES E TECNOLOGIA (FINOM)**, v. 1, n. 16, p. 423-435, 2019.

TARIQUE, M., NAQVI, RA, SANTOSH, KV, KAMALI, VK, KHANNA, N., & RAO, DN (2015). **Associação dos genótipos TNF- α -308 (GG), IL-10-819 (TT), IL-10-1082 (GG) e IL-1R1 + 1970 (CC) com a suscetibilidade e progressão da hanseníase na população do norte da Índia.** *Cytokine*, 73 (1), 61-65. doi: 10.1016 / j.cyto.2015.01.014

WHO. Leprosy. **Number of new leprosy cases 2016**, 10 out. 2018. DOI
http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leprosy/leprosy.html. Disponível em: 2016. Acesso em: 07 jan. 2020.