

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RENATA CAMPOS CADIDÉ

Associação de polimorfismos únicos de nucleotídeos de genes de citocinas  
com a esclerose múltipla

Maringá

2014

RENATA CAMPOS CADIDÉ

Associação de polimorfismos únicos de nucleotídeos de genes de citocinas  
com a esclerose múltipla

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde Área de concentração: Saúde humana

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luiza Tamie Tsuneto

Maringá

2014

# FOLHA DE APROVAÇÃO

RENATA CAMPOS CADIDÉ

Associação de polimorfismos únicos de nucleotídeos de genes de  
citocinas com a esclerose múltipla

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luiza Tamie Tsuneto  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Sell  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jeane Eliete Laguila Visentainer  
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 31 de março de 2014.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C124a Cadidé, Renata Campos  
Associação de polimorfismos únicos de nucleotídeos  
de genes de citocinas com esclerose múltipla /  
Renata Campos Cadidé. -- Maringá, 2014.  
60 f. : il., tabs.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luiza Tamie Tsuneto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

1. Citocinas. 2. Esclerose múltipla. 3.  
Polimorfismos. 4. SNPs. I. Tsuneto, Luiza Tamie,  
orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro  
de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 21.ed. 616.998

AHS

## DEDICATÓRIAS

Dedico esta à minha mãe... exemplo de força e determinação, que tanto se orgulhou quando entrei na Universidade...

E ao meu pai, que com muito amor sempre fez de tudo por mim! Meu porto seguro... exemplo de vida, dignidade, responsabilidade, dedicação e amor.

*“Pai: exemplo de valor e retidão.  
Ensino, espelho, esperança.  
Semente boa plantada em nós lá na infância.  
Que germina pela vida afora, estruturando o ser  
e o não ser.  
Como falar sobre esse amor?  
Se amor de filho para pai às vezes é calado,  
contido?  
Dizer é amor apenas, talvez baste.  
Amor genuíno, em sua máxima expressão.”  
(Anderson Cavalcante)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita misericórdia e benignidade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Luiza Tamie Tsuneto, que me acolheu em seu laboratório com muito carinho e disponibilidade. Agradeço por todas as oportunidades, pela confiança e motivação, e ainda pela orientação, profissionalismo e disciplina com que conduziu este trabalho, principalmente por acreditar em minha capacidade em um momento de grande transição, o que sem dúvida contribuiu muito para meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por estar sempre presente e pela paciência, minha profunda e eterna admiração, respeito, carinho e gratidão.

Ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Sueli Donizete Borelli pela colaboração para a realização deste trabalho, pela atenção, orientação dos dados clínicos e auxílio na seleção das amostras, meu muito obrigada.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Imunologia Básica, pelo acolhimento, auxílio, paciência e pela cooperação. Agradeço em especial ao Prof. Rafael Campos Bezerra, pelas canções que embalaram cada linha desta dissertação.

Aos amigos do Laboratório por todas as horas que passamos juntos, pela amizade e por todo apoio durante o desenvolvimento de minha pesquisa. Agradeço em especial à Josiane Bazzo de Alencar e ao Everton Fernando Alves pelo companheirismo em cada etapa de trabalho.

Aos grandes amigos por estarem sempre presentes em minha vida, tornando esta caminhada mais alegre: em especial à Licélia Justi Braga, Mariana Trevisan Justi, Fernanda Gabriel e Kátia Lorena Lima, por todo o apoio em momentos de indecisão, João Marcos Mariani, pelas palavras de carinho sempre dirigidas em momentos propícios, as companheiras de orações que sempre me incentivaram a continuar. Meu eterno amor.

Aos professores do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde por tudo que me ensinaram e aos colegas, pelo convívio e aprendizado. Meu muito obrigada e meus votos de sucesso à todos.

## Associação de polimorfismos únicos de nucleotídeos de genes de citocinas com a esclerose múltipla

### RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune multifatorial caracterizada por inflamação no sistema nervoso central (SNC). Nessa doença as proteínas que constituem a bainha de mielina são consideradas um dos principais alvos de degeneração e seu comprometimento pode causar distúrbios na transmissão sináptica seguida de prejuízo funcional. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo de associação de marcadores genéticos de citocinas e de receptores de citocinas entre pacientes e um grupo controle de indivíduos saudáveis. Foram coletadas amostras de 82 pacientes com esclerose múltipla, assistidos pelo Centro de Referência de Doenças Desmielinizantes do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brasil) e 170 controles saudáveis, não relacionados. A genotipagem de citocinas e de receptores de citocinas foi determinada pelo método de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Primer*) utilizando um kit comercial (*Cytokine Genotyping Kit, Invitrogen™*). Foram encontradas diferenças significativas nas frequências dos alelos, genótipos e haplótipos das citocinas entre casos e controles. Foram atribuídas influências significativas para os SNPs de genes de citocinas pró-inflamatórias *TNFA*<sup>-308, -238</sup> (GG/GA, GA/AA e GG/AG)<sup>-238</sup> (G/G, A/A, G e A)<sup>-308</sup> (G/G), *IL6*<sup>-174, nt565</sup> (GG/CG)<sup>nt565</sup> (G/G e G) e anti-inflamatórias *IL4RA*<sup>+1902</sup> (A/A, A e G) e *IL10*<sup>-1082, -819, -592</sup> (GCC/ATA e ACC/ACC). Os resultados sugerem que mutações de base única em genes de citocinas e receptores de citocinas são possíveis determinantes de pré-disposição à EM. Tais evidências poderão auxiliar na compreensão da etiologia da EM, tanto para inovações em pesquisa na área de marcadores genéticos associados à doença, quanto para a elaboração de procedimentos que possam minimizar os seus impactos (social e individual), através de estratégias na prevenção, diagnóstico, aconselhamento genético e tratamento.

**Palavras-chave:** citocinas; esclerose múltipla; polimorfismo; SNPs.

## Association of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes with multiple sclerosis

### ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a multifactorial autoimmune disease characterized by inflammation in the central nervous system (CNS). In this disease the proteins that form the myelin sheath are considered one of the main targets of degeneration and its impairment can cause disorders in synaptic transmission followed by functional impairment. This work aimed to perform an association study of genetic markers of cytokines between patients and a group control of healthy individuals. Samples were collected from 82 patients with MS, assisted by the Reference Center for Demyelinating Diseases of the Hospital of the State University of Londrina (Paraná, Brazil) and 170 healthy controls, not related. The genotyping of cytokines was determined by method PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Primer) using commercial kit (Cytokine Genotyping Kit, Invitrogen™). There were significant differences in the frequencies of alleles, genotypes and haplotypes of cytokines between cases and controls. Was assigned significant influence, the following polymorphic variants in genes of proinflammatory cytokines *TNFA*<sup>-308, -238</sup> (GG/GA, GA/AA and GG/AG)<sup>-238</sup> (G/G, A/A, G and A)<sup>-308</sup> (G/G), *IL6*<sup>-174, nt565</sup> (GG/CG)<sup>nt565</sup> (G/G and G) and anti-inflammatory *IL4RA*<sup>+1902</sup> (A/A, A and G) and *IL10*<sup>-1082, -819, -592</sup> (GCC/ATA and ACC/ACC). The results suggest that single base mutations in genes for cytokines and cytokine receptors potential determinants are predisposed to MS. Such evidence may assist in understanding the etiology of MS, both for innovations in research on genetic markers associated with the disease, and for the development of procedures that can minimize their impacts (social and individual) through strategies in the prevention, diagnosis, genetic counseling and treatment.

**Keywords:** cytokines; multiple Sclerosis; polymorphism; SNPs.



Dissertação elaborada e formatada conforme as Normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): *Journal of Neuroimmunology* disponível em: <<http://www.elsevier.com/journals/journal-of-neuroimmunology/0165-5728/guide-for-authors>>

# SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I.....	11
1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA .....	11
1.1.1 Histórico.....	11
1.1.2 Aspectos imunológicos .....	13
1.1.3 Hipótese da higiene e fatores ambientais .....	16
1.1.4 Citocinas.....	17
1.2 JUSTIFICATIVA .....	19
1.3. OBJETIVOS.....	19
1.3.1 Geral.....	19
1.3.2 Específicos .....	19
1.4. REFERÊNCIAS .....	19
2. CAPÍTULO II.....	26
3. CAPÍTULO III .....	59
3.1 CONCLUSÕES .....	59
3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	60

## 1. CAPÍTULO I

### 1.1. ESCLEROSE MÚLTIPLA

#### 1.1.1 Histórico

A esclerose múltipla (EM) é a patologia não-traumática que mais causa incapacidade em adultos jovens na Europa (PUGLIATTI *et al.*, 2002).

Estudos epidemiológicos mostram um aumento contínuo de sua incidência nas últimas décadas, principalmente em países desenvolvidos. Estima-se que a doença afete cerca de 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, calcula-se que a prevalência da doença seja 15-18 indivíduos/100.000 habitantes (FRAGOSO *et al.*, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2011).

Na década de 1940, dados provenientes do *National Multiple Sclerosis Society (NMSS)* preconizavam que a EM era uma enfermidade exclusiva de caucasianos europeus, sobretudo europeus, e que acometia igualmente homens e mulheres. Entretanto, estudos recentes demonstram que a doença é observada em diversas etnias, inclusive notada em regiões antes ditas de baixo risco, e que a relação de prevalência por gênero aproxima-se de 3 mulheres para cada 1 homem (BOVE; CHITNIS, 2014).

A EM apresenta uma variabilidade ampla de sinais e sintomas clínicos podendo causar danos parciais ou completos de qualquer função controlada pelo SNC. Os sintomas típicos da EM incluem episódios de dormência, parestesia, fraqueza, perda da visão, alteração da marcha, alteração na micção, dentre outros. Em consequência da desmielinização, da morte de oligodendrócitos, do dano axonal, gliose e neurodegeneração, alguns pacientes passam a apresentar piora da função neurológica e acumulação de deficiências, quadro esse característico da progressão (GELFANT, 2014; HARTUNG *et al.*, 2014).

A doença inicia-se entre 20-40 anos de idade, sendo rara antes dos 15 ou após os 50 anos (REIPERT, 2004; SAWER, 2009). De acordo com a evolução do grau de neurodegeneração do SNC, a doença divide-se em 3 subgrupos clássicos: remitente-

recorrente (RR), primária progressiva (PP) e secundária progressiva (SP) (FRAGOSO *et al.*, 2010; LANA-PEIXOTO *et al.*, 2011). A RR, também chamada de surto-remissiva, é a mais comum e caracteriza-se por surtos, seguidos por períodos de remissão com recuperação total ou parcial dos efeitos colaterais. A PP não apresenta surtos, após certo período de tempo desenvolve-se uma perda gradual e intensa das funções do corpo. Já a SP inicia-se com quadros de surtos e gradualmente instala-se uma perda funcional com recuperações incompletas (OLIVEIRA; SOUZA, 1998).

O impacto social e econômico que a doença acarreta, devido à perda de mão-de-obra e ao elevado custo do tratamento, somado aos transtornos psicológicos, tem sido potencializado proporcionalmente ao aumento de prevalência constatado nos últimos anos (MACHADO *et al.*, 2010).

A origem da doença é remota e foi constatada nos relatos de duas personagens históricas. A primeira trata-se de Augustus d'Esté (1794 -1848), neto de George III, primo da rainha da Inglaterra, Victoria, que escreveu em seu diário pessoal sua enfermidade, que posteriormente foi reconhecida como EM. A segunda, trata-se de Santa Lidwina de Schiedam, uma freira Holandesa, nascida em 1380, que sofria de uma doença debilitante cujo sintomas eram similares aos característicos da EM (MURRAY, 2005).

A particularidade da EM começou a ser notada a partir de ilustrações de Robert Carswell e Jean Cruveilhier. Mais tarde, Frerichs (1849), Rokitansky (1857) e Vulpian (1866) detectaram achados clínicos e histopatológicos, em seus experimentos similares aos atribuídos à EM, contudo não a identificaram como uma nova doença (COMPSTON *et al.*, 2005).

Apenas em 1868, a EM foi definida como entidade clínica. Jean Martin Charcot denominou-a como uma doença inflamatória desmielinizante que afetava o sistema nervoso central (SNC), caracterizada pela ocorrência de lesões na substância branca encefálica ou na medula espinal, que ocasionavam os sintomas clínicos observados nos pacientes. O médico chamou a doença de *sclerose en plaques*. A mielina foi descoberta pouco tempo depois, embora sua exata importância fosse desconhecida (COMPSTON, 2006).

Charcot acreditava que a EM era um distúrbio inflamatório que acometia o SNC (COMPSTON, 2004). Contudo, em 1933, com o advento da vacina anti-rábica, essa teoria passou a ser contestada.

A vacina anti-rábica, proposta por Louis Pasteur em 1885, provocou em alguns pacientes paralisia e outras disfunções neurológicas semanas após receberem a vacina, composta basicamente de um extrato da medula espinal e do vírus da raiva. Os cientistas notaram que a doença desenvolvida era distinta da raiva, pois apresentava não só perda de células nervosas como também infiltrados de células linfóides e desmielinização em torno dos vasos sanguíneos (BAXTER, 2007).

Pasteur (1933) observou que os coelhos utilizados na produção da vacina passaram a apresentar os mesmos sintomas dos pacientes submetidos ao tratamento. Ele atribuiu o fato as repetidas injeções, que teriam provocado uma reação alérgica nos pacientes, sendo nomeado como encefalomielite pós-vacinal aguda ou encefalomielite alérgica (EA) (BAXTER, 2007; BERNSTEIN; MILLER, 2010).

Thomas Rivers foi o primeiro a replicar o experimento de Pasteur em outros animais e notou que a aplicação do extrato de cérebro sem a presença do vírus foi capaz de desenvolver uma doença similar a definida por Pasteur, questionando assim a teoria de que se tratava de uma doença infecciosa. Ele nomeou-a como encefalomielite alérgica experimental (EAE) e conduziu experiências que objetivaram reproduzir a EAE em animais através da imunização com extrato de cérebro (RIVERS *et al.*, 1933).

Tais eventos serviram de base para proposição da natureza imune na EM. Desde então, a EAE tornou-se o modelo animal primário para a doença e para a investigação dos mecanismos básicos de reações do sistema imune contra o tecido do cerebral.

### **1.1.2 Aspectos imunológicos**

A suspeita da participação do sistema imune na patogênese da EM teve origem em experimentos feitos em coelhos que tinham recebido injeções de extrato de cérebro e passaram a apresentar concentração de anticorpos IgG, específicos contra esses componentes. Quanto mais extrato antigênico era administrado, maior era o título de anticorpos constatado (SCHWENTKER; RIVERS, 1934).

As evidências associando anticorpos com a EM também foram demonstradas em estudos que descreveram o aumento dos níveis de imunoglobulina (Ig) no líquido cefalorraquidiano (LCR) de cobaias após a inoculação do extrato de cérebro (KABAT *et al.*, 1942).

Após a constatação da participação do sistema humoral nos experimentos envolvendo a EAE, suspeitou-se do papel das células do sistema imune. Os primeiros experimentos que visavam a comprovação dessa idéia partiram de estudos de transferência de células de nódulos linfáticos, mas não de Ig, para ratos saudáveis, que passaram a apresentar a doença (PHILIP; PATTERSON, 1960).

Em outro estudo, ratos timectomizados no nascimento não desenvolviam EAE na vida adulta, devido a falta de células T (ARNASON *et al.*, 1962).

Após a constatação de que a EAE poderia ser reproduzida em animais pela transferência de células T CD4<sup>+</sup> específicas para mielina (PETTINELLI; MACFARLIN, 1981), chegou-se à conclusão de que a EM seria uma doença mediada pela imunidade celular, principalmente pelos linfócitos do tipo T CD4<sup>+</sup> do perfil Th1. Como as células do perfil Th2 antagonizam as funções das células do perfil Th1, acreditou-se que o desvio imune para o perfil Th2 pudesse prevenir ou curar a doença (LAFAILLE *et al.*, 1997).

Estudos recentes têm sugerido que o sistema imune inato também desempenha um papel importante tanto na iniciação quanto na progressão da EM, por influenciar a função efetora de células B e T (GANDHI *et al.*, 2010). Atualmente, trabalha-se com a hipótese de que linfócitos T auto-reativos com receptores para componentes da mielina, capazes de evadir à seleção tímica por mimetismo molecular, migrariam para o SNC onde se tornariam reativos ao encontrar o seu antígeno alvo e desencadeariam a resposta inflamatória (HARTUNG *et al.*, 2014).

Sendo assim a fisiopatologia da EM é agora conhecida por envolver vários aspectos da resposta imune, incluindo imunidade inata e a imunidade adaptativa. Embora a etiologia permaneça desconhecida a EM é considerada uma doença autoimune multifatorial, onde as desordens imunológicas são decorrentes de interações entre fatores ambientais e genéticos que conferem suscetibilidade individual.

Quanto aos fatores genéticos que contribuem para a autoimunidade, uma constante compartilhada por toda a gama de doenças autoimunes é a associação genética com a

região de HLA de classe II no cromossomo 6p21 (VANDENBROECK, 2012). O grupo alélico HLA- DR15 confere a maior parte do risco genético para o desenvolvimento da EM. Os processos envolvidos com moléculas HLA de classe II e sua contribuição para o desenvolvimento de doenças autoimunes ainda são pouco conhecidos mas provavelmente envolvem o recrutamento de células T autoimunes durante a seleção central no timo e sua posterior expansão clonal (MOHME *et al.*, 2013).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> reconhecem epítomos inseridos na molécula HLA de classe II localizados na superfície de células dendríticas (CD), macrófagos (MØ) e alguns outros tipos celulares denominadas células apresentadoras de antígenos (APC's). As proteínas que compõem esse epítomo no caso da EM são as da bainha de mielina como: a proteína proteolípídica (PLP), Glicoproteína associada ao oligodendrócito(MOG) e a proteína básica da mielina(PAM) que são processadas por essas células apresentadoras de antígenos (APC's), e ocasionam a ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. A suscetibilidade do hospedeiro à EM está associada a ativação seletiva e diferenciação desses linfócitos em células efetoras, no caso da EM do perfil Th1, as quais secretam um padrão de citocinas específicas: interleucina IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IFN- $\gamma$ , e fator de necrose tumoral (TNF) - $\alpha$ , as quais são conhecidas como citocinas pró-inflamatórias. Já a resistência à doença está relacionada à resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do perfil Th2, que secretam citocinas do tipo IL-4, IL-5, IL-10, TGF- $\beta$  (DHIB-JALBUT, 2007; SALOU *et al.*, 2013).

A diferenciação para o perfil Th1 promove o quadro de inflamação crônica do SNC e a desmielinização (CONSTANTINO *et al.*, 2008; OREJA-GUEVARA *et al.*, 2012). Recentemente considera-se que também ocorra a ativação do subgrupo Th17 que inclui a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17, IL-6, IL-21, IL-22, IL-23 e TNF-  $\alpha$ , importante na imunopatogênese da EM (KOSTIC, 2010; ABBAS *et al.*, 2011; LOWTHER *et al.*, 2013).

Na imunidade inata, uma série de constatações evidenciaram a importância dos receptores semelhantes a Toll (TLRs) na cooperação de eventos fisiopatológicos iniciais da doença, na ausência de células T, que modulam a produção de citocinas e quimiocinas (MARIK *et al.*, 2007; HERNANDEZ-PEDRO *et al.*, 2013). Também tem sido relatadas funções neuroprotetoras induzidas por esses receptores (BSIBSI *et al.*, 2006).

Outros estudos verificaram associação de risco para EM com *NOD-like receptors* (NLRs), que compõem uma família de receptores capazes de reconhecer padrões

moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns-PAMP*) e padrões moleculares associados a danos (*Damage-associated molecular pattern molecules-DAMP*), que geram formas ativas da citocina inflamatória IL-1, que contribui no quadro inflamatório da doença (MARTÍNEZ *et al.*, 2007; ZHONG *et al.*, 2013).

### 1.1.3 Hipótese da higiene e fatores ambientais

De acordo com a chamada hipótese da higiene, as condições de vida modernas em nações industrializadas, onde a assepsia é propagada como a melhor forma de proteção contra microorganismos, têm levado a uma diminuição da carga infecciosa na infância. À princípio, acreditava-se que a prevenção representaria um efeito protetor contra as doenças alérgicas e autoimunes subsequentes. Contudo, dados epidemiológicos, particularmente de estudos de migração, mostraram que os indivíduos que migravam de áreas de baixa incidência de higienização para de alta incidência adquiriam doenças imunológicas com maior facilidade. As condições ambientais dos países desenvolvidos como a poluição, mudanças na dieta e amamentação, menor exposição a luzes UV e ao ar livre e aumento da exposição aos alérgenos domiciliares, também representam fatores que contribuem na propagação dessas doenças (SOTGIU *et al.*, 2003.; OKADA *et al.*, 2010).

A hipótese da higiene ainda descreve um cenário hipotético em que o equilíbrio entre respostas do perfil Th1, responsável pela defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e virais, e perfil Th2, responsável pela defesa contra infecções parasitárias, seria fundamental para respostas imunológicas saudáveis, a consequência de reduzir o contato com esses antígenos durante a infância seria o desequilíbrio da tolerância ao próprio (SOTGIU *et al.*, 2003).

Alguns estudos indicam que as infecções podem desempenhar um papel causador ou protetor na EAE e na EM (FLEMING; FABRY, 2007). No modelo animal, mostrou-se que a vacinação ou infecção de camundongos com *Schistosoma mansoni* reduz a gravidade da doença (LA FLAMME *et al.*, 2003). Semelhança notada em estudos feitos com outros parasitas (*Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*) que mostraram efeito protetor contra o desenvolvimento ou exacerbação de EM. Atribuiu-se o fato ao



desenvolvimento de um perfil Th2 direcionado ao combate do agente etiológico com produção de citocinas como: IL-4, IL-5 e IL-13 (LIBBEY *et al.*, 2013).

Os agentes patogênicos associados com o desenvolvimento ou agravamento da EM incluem bactérias, tais como *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* (KIDD, 2001), as enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, as quais funcionam como superantígeno que acabam interagindo com as moléculas MHC de classe II das APC's e com os receptores dos linfócitos T CD4+, levando a uma intensa ativação dessas células (MULVEY *et al.*, 2011) e vírus do herpes (SOTELO *et al.*, 2007).

Alguns fatores do ambiente podem influenciarem o risco de desenvolvimento da EM, juntamente com os fatores genéticos já mencionados (EBERS, 2013). Os efeitos da latitude são considerados fatores de risco conforme a distância do indivíduo à linha do equador, ou seja, quanto maior for a latitude maior será a incidência da doença nestas localidades. Simultâneo a esse fato, atribui-se maior risco de ocorrência de portadores de EM vivendo em regiões onde impera clima temperado à frio e menor risco em regiões com clima subtropical à tropical (TAYLOR *et al.*, 2010; SIMPSON *et al.*, 2011).

Recentemente, pesquisadores demonstraram que a época de nascimento do indivíduo, correlacionada às estações do ano, pode influenciar o desenvolvimento de doenças autoimunes. Toma-se como exemplo que indivíduos nascidos na primavera possuem maior probabilidade de apresentarem quadros alérgicos no início de vida e respostas de hipersensibilidade em anos seguintes (BECKER *et al.*, 2013).

Outros fatores que podem cooperar no desenvolvimento da EM são: O tabagismo, uma vez que os componentes do cigarro podem influenciar a autoimunidade, por indução de mutações, ativação de genes supressores tumorais e oncogenes e danos oxidativos aos componentes nucleares (ASADOLLAHI *et al.*, 2013; HEDSTRÖM *et al.*, 2013); A hipovitaminose D, que desencadeia um processo de agressão ao próprio devido à capacidade de interferir na tolerância imunológica (KOVEN *et al.*, 2013; SHAHBEIGI *et al.*, 2013), porém esses efeitos ainda são discutíveis (ADZEMOVIC *et al.*, 2013; HATAMIAN *et al.*, 2013).

#### **1.1.4 Citocinas**

As citocinas são fatores-chave na regulação das respostas inflamatórias e podem atuar na fisiopatologia da EM. São descritas como um grupo heterogêneo de proteínas, capazes de mediar funções da imunidade inata e adaptativa (ZHANG; AN, 2007). Possuem um papel importante na patogênese de doenças inflamatórias pois são capazes de controlar tanto a intensidade quanto a qualidade da resposta imune, influenciando atividades de diferenciação, proliferação, e sobrevivência das células, aumentando (pró-inflamatórias) ou diminuindo (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Genes de citocinas e dos receptores de citocinas têm tradicionalmente atraído grande interesse como genes candidatos para doenças autoimunes (VANDENBROECK, 2012).

As diferenças observadas na produção de citocinas entre os indivíduos podem ser parcialmente explicadas por polimorfismos dos genes. Vários genes de citocinas foram identificados e desempenham papel na suscetibilidade de várias doenças autoimunes (JAVOR, 2007). Devido a essas características, são referidas como candidatas na suscetibilidade genética da EM (IMITOLA *et al.*, 2005; CONSTANTINO *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2012).

Mutações pontuais, que consistem na substituição de um único par de nucleotídeos, denominadas *single nucleotide polymorphism (SNP)*, podem ter níveis de impacto sobre a EM e modificar sua expressão, causando predisposição para seu desenvolvimento, alterando a gravidade e extensão de comprometimento da doença e interferindo na eficácia de tratamentos (IMITOLA *et al.*, 2005; SZOLNOKI *et al.*, 2009).

Presença de *SNP* em regiões reguladoras pode alterar a ligação dos fatores de transcrição nos sítios dos genes promotores e controlar a produção de citocinas, esses efeitos podem influenciar a atividade ou remissão da doença (SZOLNOKI *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, alguns estudos avaliaram o papel dos genes de citocinas na suscetibilidade à EM, notou-se que a substituição de nucleotídeos únicos seria responsável por variações fenotípicas associadas à doença como desenvolvimento de surtos ou melhora de sintomas, entretanto esses estudos ainda exigem consenso (JOHNSON *et al.*, 2004; LEYVA *et al.*, 2005; MIHAILOVA *et al.*, 2005; JAVOR *et al.*, 2007; QUIRINNO-SANTOS *et al.*, 2007; SARIAL *et al.*, 2008; LOSONCZI *et al.*, 2009; HEIDARI *et al.*, 2011; MIROWSKA-GUZEL *et al.*, 2011; SHAGBAZI *et al.*, 2011; KARIMABAD *et al.*, 2013).

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A EM é uma doença do sistema nervoso de caráter autoimune e de causa indefinida. Até hoje não existe cura para a doença e o tratamento é paliativo com drogas imunomoduladoras. Em muitas doenças auto imunes foram constatadas participação de genes de resposta imune e inata no desenvolvimento da doença. Estudos de associação de marcadores genéticos com suscetibilidade ou resistência a doenças autoimunes englobam mecanismos que consistem em compreender a ação de genes polimórficos.

A busca de fatores genéticos é importante para a compreensão da etiopatogenicidade da doença e pode auxiliar no desenvolvimento de novas formas de tratamento que sejam mais eficazes. Além disso, descobertas que possibilitem a melhor compreensão da EM pode diminuir o impacto social que esta doença tem na sobrevivência de adultos jovens.

## 1.3. OBJETIVOS

### 1.3.1 Geral

Verificar a existência de possíveis associações entre variantes polimórficas em genes de citocinas e de receptores de citocinas e a EM.

### 1.3.2 Específicos

Caracterizar os genótipos e estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas de variantes para as referidas posições, de *SNPs* de citocinas, em grupo de indivíduos com EM e num grupo de indivíduos saudáveis, não aparentados;

Avaliar se existe diferença nas frequências de *SNPs* de citocinas entre os grupos de pacientes e controles.

## 1.4. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592p. ISBN 978-85-352-4744-2

ADZEMOVIC, M. Z. *et al.* Efficacy of vitamin D in treating multiple sclerosis-like neuroinflammation depends on developmental stage. **Experimental neurology**, New York, v.249, p.39-48, Nov. 2013.

ARNASON, B. G. *et al.* Role of the thymus in immune reactions in rats. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 116, p.177-186, Ago. 1962.

ASADOLLAHI, S. *et al.* Cigarette smoking and associated risk of multiple sclerosis in the Iranian population. **Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia**, Edinburgh, v.20, n.12, p.1747-1750, Dez. 2013.

BAXTER, A. G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Nature reviews Immunology**, Londres, v.7, p.904-912, Nov. 2007.

BECKER, J. *et al.* Season of birth as a risk factor for multiple sclerosis in Brazil. **Journal of the neurological sciences**, Amsterdam, v. 329, n.1-2, p.6-10, Jun. 2013.

BERNSTEIN, A.; MILLER, G. W. Oxidative signaling in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Toxicological sciences**, Orlando, v. 114, n.2, p.159-161, Jan. 2010.

BOVO, R.; CHITNIS, T. The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis. **Multiple sclerosis: clinical and laboratory research**, London, v.20, n.10, p.1-7, Fev. 2014.

BSIBSI, M. *et al.* Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. **Glia**, New York, v.53, n.7, p.688-695, Mai, 2006.

CHEN, S.J. *et al.* Current status of the immunomodulation and immunomediated therapeutic strategies for multiple sclerosis. **Clinical and developmental immunology**, Cario, p. 1-16, Dez. 2012.

COMPSTON, A. Making progress on the natural history of multiple sclerosis. **Brain: a journal of neurology**, Londres, v.129, p.561-563, Jun. 2006.

COMPSTON, A. The marvellous harmony of the nervous parts': the origins of multiple sclerosis. **Clinical medicine**, Londres, v.4, n.4, p.346-354, Jul-Ago. 2004.

COMPSTON, A. *et al.* **The story of multiple sclerosis**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 992p. ISBN 978-0-443-07271-0

COSTANTINO, C.M.; BAECHEER-ALLAN, C.; HAFLER, D.A. Multiple sclerosis and regulatory T cells. **Journal of clinical immunology**, Amsterdam, v.28, p.697-706, Set. 2008.

DE OLIVEIRA, C. M. B. *et al.* Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 260-265, 2011.

DHIB-JALBUT, S. Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. **Neurology**, Minneapolis, v.68, n.22, p.43-54, Mai. 2007.

EBERS, G. Interactions of environment and genes in multiple sclerosis. **Journal of the neurological sciences**, Amsterdam, v.334, n.1-2, p.161-163, Nov. 2013.

FLEMING, J.; FABRY, Z. The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. **Annals of neurology**, New York, v.61, n.2, p.85-89, Feb. 2007.

FRAGOSO, Y. D. *et al.* The effect of multiple sclerosis on the Professional life of a group of brazilian patients. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.68, n.6, p.914-917, Dez. 2010.

GANDHI, R.; LARONI, A.; WEINER, H. L. Role of innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Journal of neuroimmunology**, Amsterdam, v.221, n.1-2, p.7-14, Abr. 2010.

GEFALD, J. M. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. **Handbook of clinical neurology**, Amsterdam, v.122, p.:269-290, 2014.

HARTUNG, H. P.; AKTAS, O.; MENGE, T.; KIESEIER, B. C. Immune regulation of multiple sclerosis. **Handbook of clinical neurology**, Amsterdam, v.122, p.3-14, 2014.

HATAMIAN, H. *et al.* Is serum vitamin D levels associated with disability in patients with newly diagnosed multiple sclerosis. **Iranian journal of neurology**, Tehran, v.12, n.2, p.41-46, Feb. 2013.

HEDSTRÖM, A. K. *et al.* Smoking and multiple sclerosis susceptibility. **European journal of epidemiology**, Dordrecht, v.28, p.867-874, Out. 2013.

HEIDARI, M. BEHMANESH, M.; SAHRAIAN, M. A. Variation in SNPs of the IL7Ra gene is associated with multiple sclerosis in the Iranian population. **Immunological investigations**, New York, v.40, n.3, p.279-289, 2011.

HERNANDEZ-PEDRO, N. Y. *et al.* Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. **Clinical & developmental immunology**, Cario, Set. 2013.

IMITOLA, J.; CHITNIS, T.; KHOURY, J.S. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. **Pharmacology & therapeutics**, Oxford, v.106, p.163-177, Mai. 2005.

JAVOR, J. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in the healthy Slovak population. **International journal of immunogenetics, England**, v.34, n.4, p.273-280. Ago. 2007.

JOHNSON, V.J.; YUCESOY, B.; LUSTER, M.I. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. **Cytokine**, San Diego, v.24, p.135-141, Set. 2004.

KABAT, E. A.; MOORE, D. H.; LANDOW, H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v.21, n.5, p.571-577, Set. 1942.

KARIMABAD, M. N. *et al.* Is the IL-10 promoter polymorphism at position -592 associated with immune system-related diseases? **Inflammation**, New York, v.36, n.1, p.35-41, Fev. 2013.

KIDD, P. M. Multiple sclerosis, an autoimmune inflammatory disease: prospects for its integrative management. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic, Dover**, v.6, n.6, p.540-566, Dez. 2001.

KOVEN, N. S. *et al.* Vitamin D and long-term memory in multiple sclerosis. **Cognitive and behavioral neurology: official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology**, Hagerstown, v. 26, p.155-160, Ago. 2012.

LA FLAMME, A. C.; RUDDENKLAU, K.; BÄCKSTRÖM, T. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Infection and immunity**, Washington, v.71, n.9, p.4996-5004, Set. 2003.

LAFAILLE, J. J. *et al.* Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. **The Journal of experimental medicine**, New York, v.186, n.2, p.307-312, Jul. 1997.

LANA-PEIXOTO, M.A. *et al.* The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.70, n.2, p.102-107, Fev. 2011.

LEYVA, L. *et al.* IFNAR1 and IFNAR2 polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon-beta treatment response. **Journal of neuroimmunology**, Amsterdam, v.163, p.165-171, Jun. 2005.

LIBBEY, J. E.; CUSICK, M. F.; FUJINAMI, R. S. Role of pathogens in multiple sclerosis. **International reviews of immunology**, London, Nov. 2013.

LOSONCZI, E. *et al.* Tumor necrosis factor alpha gene (TNF- $\alpha$ ) -376 polymorphism in Hungarian patients with primary progressive multiple sclerosis. **Journal of neuroimmunology**, Amsterdam, v. 208, p.115-118, Mar. 2009.

LOWTHER, D. E. *et al.* Th1 not Th17 cells drive spontaneous MS-like disease despite a functional regulatory T cell response. **Acta neuropathologica**, Berlin, v.126, n.4, p.501-515, Out. 2013.

MACHADO, A. *et al.* Esclerose múltipla: implicações socioeconômicas. **Acta médica portuguesa**, Lisboa, v.23, n.4, p.631-640, Nov. 2010.

MARIK, C. *et al.* Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? **Brain: a journal of neurology**, Oxford, v.130, n.11, p.2800-2815, Nov. 2007.

MARTÍNEZ, A. *et al.* Role of the MHC2TA gene in autoimmune diseases. **Annals of the rheumatic diseases**, London, v.66, n.3, p.325-329, Mar. 2007.

MIHAILOVA, S. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients. **Journal of neuroimmunology**, Amsterdam, v. 168, p.138-143, Nov. 2005.

MIROWSKA-GUZEL, D. *et al.* Association of IL1A, IL1B, ILRN, IL6, IL10 and TNF- $\alpha$  polymorphisms with risk and clinical course of multiple sclerosis in a polish population. **Journal of neuroimmunology**, Amsterdam, v.236, p.87-92, Jul. 2011.

MOHME, M. *et al.* HLA-DR15 derived self-peptides are involved in increased autologous T cell proliferation in multiple sclerosis. **Brain: a journal of neurology**, Oxford, v.136, p.1783-1798, Jun. 2013.

MULVEY, M. R. *et al.* Staphylococcus aureusharbouring Enterotoxin A as a possible risk factor for multiple sclerosis exacerbations. **Multiple sclerosis: clinical and laboratory research**, London, v.17, n.4, p.397-403, Abr. 2011.

MURREY, T. J. Multiple Sclerosis: The History of a Disease. **Journal of the royal society of medicine**, Londres, v.98, p.289, Jun. 2005.

OKADA, H. *et al.* The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases an update. **Clinical and experimental immunology**, Electronic, v.160, n.1, p.1-9, Abr. 2010.

OLIVEIRA, E. M. L.; SOUZA, N. A. Esclerose múltipla. **Revista de neurociências**, Madrid, v.6, n.3, p. 114-118, Set-Dez. 1998.

OREJA-GUEVARA, C. *et al.* TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. **BMC neurology**, London, v.12, n.95, Set. 2012.

PEIXOTO, M.A.L. *et al.* The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.70, n.2, p.102-107, Fev. 2011.

PETTINELLI, C. B.; MCFARLIN, D. E. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. **The Journal of immunology**, Baltimore, v.127, n.4, p.1420-1423, Out. 1981.

PHILIP, Y.; PATERSON, M. D. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. **The Journal of experimental medicine**, New York, v.111, p.119-136, Jan. 1960.

PUGLIATTI, M.; SOTGIU, S.; ROSATI, G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. **Clinical neurology and neurosurgery**, Amsterdam, v.104, n.3, p.182-191, Jul. 2002.

QUIRICO-SANTOS, T. *et al.* Study of polymorphisms in the interleukin-4 and IL-4 receptor genes in a population of brazilian patients with multiple sclerosis. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.65, n.1, p.15-19, Mar. 2007.

REIPERT, B. Multiple sclerosis: a short review of the disease and its differences between men and women. **The journal of men's health & gender**, Amsterdam, v.4, p.334-340, Dez. 2004.

RIVERS, T. M.; SPRUNT, D. H.; BERRY, G. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 58, n.1, p. 39-53, Jun. 1933.

SALOU, M. *et al.* Adaptative immunity and pathophysiology of multiple sclerosis. **La Revue de médecine interne**, Paris, v. 34, n.8, p.479-486, Ago. 2013.

SARIAL, S. *et al.* IL-1, IL-1R and TNF $\alpha$  gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis. **Iranian journal of allergy, asthma, and immunology**, Tehran, v.7, n.1, p.37-40, Mar. 2008.

SAWER, S. The genetic aspects of multiple sclerosis. **Annals of Indian academy of neurology**, Mumbai, v.12, p.206-214, Out-Dez. 2009.

SCHWENTKER, F. F.; RIVERS, T. M. The antibody response of rabbits to injections of emulsions and extracts of homologous brain. **The Journal of experimental medicine**, New York, v.60, n.5, p.559-574, Out. 1934.

SHAGBAZI, M. *et al.* Interaction of HLA-DRB1\*1501 allele and TNF-alpha -308 G/A single nucleotide polymorphism in the susceptibility to multiple sclerosis. **Clinical immunology**, Orlando, v.139, p.277-281, Jun. 2011.

SHAHBEIGI, S. *et al.* Vitamin d3 concentration correlates with the severity of multiple sclerosis. **International journal of preventive medicine**, Isfahan, v.4, n.5, p.585-591, Mai. 2013.

SIMPSON, S. J. *et al.* Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, London, v.82, p.1132-1141. Dez. 2013.

SOTELO, J.; ORDOÑEZ, G.; PINEDA, B. Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis. **Journal of neurology**, Berlim, v.254, n.4, p.493-500, Abr. 2007.

SOTGIU, STEFANO. *et al.* Does the "hygiene hypothesis" provide an explanation for the high prevalence of multiple sclerosis in Sardinia? **Autoimmunity**, Electronic, v.36, n.5, p.257-260, Ago. 2003.

SZOLNOKI, Z. *et al.* Characteristic imprint of single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis. **Journal of molecular neuroscience**, Boston, v.38, p.166-172, Jun. 2009.

TAYLOR, B. V. *et al.* MS prevalence in New Zealand an ethnically and latitudinally diverse country. **Multiple sclerosis: clinical and laboratory research**, London, v.16, n.12, p.1422-1431, Dez. 2010.



VANDENBROECK, K. Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies. **Journal of interferon & cytokine research**, New York, v.32, n.4, p.134-151, Abr. 2012.

ZHANG, J. M.; AN J. Cytokines, inflammation, and pain. **Internacional anesthesiology clinics**, Boston, v. 45, n.2, p. 27-37, 2007.

ZHONG, Y.; KINIO, A.; SALEH, M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. **Frontiers in immunology**, Electronic, v.4, n.333, p.1-18, Out. 2013.

## 2. CAPÍTULO II

### **2.2 Artigo: “ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS ÚNICOS DE NUCLEOTÍDEOS DE GENES DE CITOCINAS COM A ESCLEROSE MÚLTIPLA NO SUL DO BRASIL”**

**“ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS ÚNICOS DE NUCLEOTÍDEOS DE GENES DE CITOCINAS COM A ESCLEROSE MÚLTIPLA NO SUL DO BRASIL”**

Renata Campos Cadidé<sup>1</sup>, Luiza Tamie Tsuneto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá (UEM); <sup>2</sup> Doutora, Docente do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da UEM.

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá (UEM). Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DBS) – Laboratório de Imunogenética – Av. Colombo, n° 5790 CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.  
[lttsuneto@uem.br](mailto:lttsuneto@uem.br)

**RESUMO**

**Introdução:** A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória autoimune do sistema nervoso cuja desmielinização decorre de um perfil Th1. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em regiões reguladoras de genes de citocinas podem modificar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença. **Objetivo:** Avaliar a influência de 22 SNPs de citocinas na EM. **Método:** Genotipagem dos SNPs de 82 pacientes com EM e 170 controles, por PCR-SSP, através do kit comercial (*Invitrogen*<sup>TM</sup>). Na análise estatística empregou-se o teste exato de Fischer e Odds ratio para  $p < 0.05$ . **Resultados:** Diferenças significativas foram observadas nas frequências de: *TNFA*<sup>-308,-238</sup>, *IL6*<sup>-174,nt565</sup> e *IL4RA*<sup>+1902</sup> e *IL10*<sup>-1082,-819,-592</sup>. **Conclusão:** Neste estudo sugerimos que SNPs em genes de citocinas podem atuar na pré-disposição à EM.

**Palavras-chave:** citocinas; esclerose múltipla; polimorfismo; SNPs.

## 1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é considerada uma doença autoimune que acomete o sistema nervoso central (SNC), provocando desmielinização e inflamação devido à infiltração de células, principalmente linfócitos T CD4<sup>+</sup> do perfil Th1 e Th17 (Sospedra e Martin, 2005; Eixarch *et al.*, 2013; Salou *et al.*, 2013). Embora a etiologia permaneça desconhecida, a EM é considerada uma doença multifatorial, onde as desordens imunológicas são decorrentes de interações entre fatores ambientais e fatores genéticos envolvendo múltiplos genes (Libbey *et al.*, 2013).

De acordo com o grau de neurodegeneração do SNC a doença divide-se em 3 subgrupos clássicos: remitente-recorrente (EM-RR), primária progressiva (EM-PP) e secundária progressiva (EM-SP) (FRAGOSO *et al.*, 2010; LANA-PEIXOTO *et al.*, 2011).

Para as doenças imunológicas causadas por linfócitos CD4<sup>+</sup>, as citocinas parecem ser alvos promissores para esclarecer os mecanismos envolvidos na fisiopatologia (Imitola *et al.*, 2005; Constantino *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012). As diferenças observadas na produção e regulação de citocinas interindividual podem ser parcialmente explicadas pela variabilidade genética. Vários polimorfismos de genes de citocinas e seus receptores foram identificados e desempenham papel na suscetibilidade de várias doenças autoimunes e têm atraído grande interesse como genes candidatos para explicar a etiologia dessas doenças (Javor, 2007; Vandembroeck, 2012).

As citocinas podem ter níveis de impacto sobre a EM e modificar sua expressão, seja induzindo uma predisposição para seu desenvolvimento, alterando sua progressão ou interferindo na eficácia do tratamento (Imitola *et al.*, 2005; Szolnoki *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, vários estudos têm avaliado o papel dos polimorfismos de genes de citocinas na suscetibilidade à EM. Embora os resultados, tomados em conjunto, ainda sejam inconclusivos, muitos mostraram que polimorfismos em genes de citocinas foram

responsáveis por variações fenotípicas associadas à doença (Johnson et al, 2004.; Quirinno-Santos *et al.*, 2007; Sarial *et al.*, 2008; Heidari *et al.*, 2011; Karimabad *et al.*, 2013).

Buscando-se elucidar essa questão, o foco deste trabalho foi realizar um estudo de associação genética de marcadores de genes de citocinas e seus receptores [posições *IL1A*<sup>-889</sup> (rs1800587), *IL1B*<sup>-511,+3962</sup>(rs16944, rs1143634),*IL1R*<sup>1970</sup>(rs2234650), *IL1RA*<sup>11100</sup>(rs315952), *IL4RA*<sup>+1902</sup>(rs1801275), *IL12*<sup>-1188</sup>(rs3212227), *IFNG*<sup>+874</sup>(rs2430561), *TGFBI*<sup>códon 10, códon 25</sup> (rs1982073, rs1800471), *TNF*<sup>-308, -238</sup>(rs1800629, rs361525), *IL2*<sup>-330,+166</sup>(rs2069762, rs2069763), *IL4*<sup>-1098, -590, -33</sup>(rs2243248, rs2243250, rs2070874), *IL6*<sup>-174,+nt565</sup>(rs1800795, rs1800797) e *IL10*<sup>-1082, -819, -592</sup> (rs1800896, rs1800871, rs1800872)]entre pacientes portadores de EM e um grupo controle.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Sujeitos

O estudo caso-controle foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brasil), sob o parecer 159/2010 conforme a Declaração de Helsinki de 1964 e suas posteriores alterações.

Oitenta e dois pacientes diagnosticados usando os critérios de McDonald e Wingerchuck, registrados no centro de referência de doenças desmielinizantes do hospital das clínicas da Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brasil), foram incluídos no estudo. Os dados foram obtidos dos registros médicos. O grupo controle consistiu de cento e setenta doadores voluntários de medula óssea saudáveis, não relacionados, selecionados à critério de semelhança (mesma área geográfica, gênero, faixa etária, etnia e condições sócio-econômicas dos pacientes).

## 2.2.Método

O DNA foi extraído a partir da separação da camada de células brancas(*buffy-coat*), obtido de 5mL de sangue periférico utilizando ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante, seguindo um protocolo adaptado *salting out* para extração de DNA de sangue coagulado (Cardozo *et al.*, 2009).

A concentração e pureza do DNA foram mensuradas pela densidade óptica através do uso do equipamento espectrofotométrico NanoDrop2000c™ (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

Os genótipos das citocinas foram determinados pela técnica de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers*) através do uso do kit comercial *Cytokine Genotyping kit* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) que fornece *primers* específicos para amplificação das regiões das seguintes citocinas *IL1A*(rs1800587), *IL1B*(rs16944, rs1143634), *IL1R*(rs2234650), *IL1RA*(rs315952), *IL2*(rs1801275), *IL12*(rs3212227), *IFNG*(rs2430561), *TGFBI*(rs1982073, rs1800471), *TNF*(rs1800629, rs361525), *IL2*(rs2069762, rs2069763), *IL4*(rs2243248, rs2243250, rs2070874), *IL6*(rs1800795, rs1800797) e *IL10*(rs1800896, rs1800871, rs1800872).

O ajuste de concentração de DNA estipulado para uso foi de 55-75 ng/μL, com pureza de 1.8 – 1.9. O DNA foi homogeneizado em solução *Amp Mixe* dispensado em placas contendo os iniciadores específicos. O material foi amplificado em termociclador (*GeneAmp™ PCR System 9700*). As condições do ciclo foram de 94°C por 2 minutos (1x); 94°C por 15 segundos seguido de 65°C por 60 segundos (10x); 94°C por 15 segundos, seguido de 61°C por 50 segundos, seguido de 72°C por 30 segundos (20x) finalizando em 4°C até a utilização.

Os *amplicons* foram separados por eletroforese, em cuba micro SSP gel System® (MGS-B, One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), em gel de agarose a 3%,

homogeneizados com 2  $\mu$ L de corante SYBRsafe (Invitrogen™, Madison, WI, USA) a 90V, 300mA, por 15 minutos. A visualização das bandas foi realizada em transiluminador UV e a interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência do *amplicon*, acompanhado pelo respectivo controle interno de acordo com o tamanho do fragmento esperado, e conforme *worksheet* fornecida pelo fabricante do Kit. As imagens foram fotodocumentadas em aparelho fotográfico.

### *1.3 Análise estatística*

As frequências dos alelos, genótipos e haplótipos em pacientes com EM e controles foram estimadas por contagem direta. A comparação das frequências observadas de ambos os grupos foi realizada através de uma tabela de contingência 2x2. O nível de significância foi calculado pelo teste exato de Fisher bi caudal e o risco de desenvolver a EM foi calculado por meio da determinação de OD (*odds ratio*) com intervalo de confiança de 95% pelo programa EpiInfo™ (versão 7). O nível de significância escolhido foi de 5%.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado pelo método de Guo e Thompson (1992), através da versão modificada do algoritmo de Markov implementado no programa Arlequin™ (versão 3.1) para evitar problemas inerentes a genotipagem.

## **3.RESULTADOS**

### *3.1 Variáveis qualitativas*

As informações demográficas para pacientes e controles são apresentados na Tabela 1. O grupo caso foi composto por 82 pacientes com esclerose múltipla (61 mulheres e 21 homens) com idade média de 45 anos, com limite mínimo de 18 anos e limite máximo de 67

anos. A idade média de início dos sintomas foi 37 anos, com limite mínimo de 10 anos e limite máximo de 58 anos e a média de duração da doença foi de 6 anos.

Quanto à forma clínica, 61 pacientes foram diagnosticados com forma remittente recorrente, 4 pacientes com secundária progressiva, 8 pacientes com primária progressiva e 9 pacientes com forma clínica não mencionada.

O grupo controle foi composto por 170 indivíduos com características saudáveis (110 mulheres e 60 homens). A idade média dos indivíduos foi de 34 anos, com limite mínimo de 18 anos e limite máximo de 54 anos.

Quanto ao grupo étnico (GE), 84% (69/82) dos pacientes foram classificados como caucasianos e 16% (13/82) como não caucasianos. O GE constatado para os controles foi 80% (136/170) de pacientes caucasianos e 20% (34/170) de não caucasianos.

Na comparação entre homens e mulheres dos dois grupos, nenhuma diferença significativa foi detectada ( $p=0,1620$ ). Na variável idade e GE também não se detectou diferenças significantes.

### *3.1 Frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas*

As frequências alélicas e genotípicas em relação aos SNPs de citocinas foram investigadas em um grupo de pacientes portadores de EM em comparação com um grupo de indivíduos saudáveis.

A distribuição das frequências genotípicas observadas e as esperadas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos.

Os resultados das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas podem ser verificados nas tabelas 2, 3 e 4 respectivamente.

No gene *IL4RA*, foi observada diferença significativa, na posição +1902, entre as frequências casos e controles para o alelo G, que apresentou uma associação negativa (18%



vs 27%, OR=0,61, p=0,044 e IC=0,38-0,97), enquanto o alelo A (82% vs 73%, OR=1,61, p=0,044 e IC=1,03-2,61) e o genótipo A/A (68% vs 54%, OR=1,87, p=0,029 e IC=1,07-3,25) apresentaram uma associação positiva com a doença.

No gene *TNFA*, na posição -238, ocorreu uma associação negativa para o alelo G (51% vs 69%, OR=0,46, p=0,0001 e IC=0,31-0,68), contrastando com uma associação positiva para o alelo A (49% vs 31%, OR=2,15, p=0,0001 e IC=1,46-3,15) entre ambos os grupos. Constatou-se ainda na posição -238 uma associação negativa para o genótipo G/G (23% vs 47%, OR=0,33, p=0,0003 e IC=0,18-0,61) e uma associação positiva para o genótipo A/A (22% vs 9%, OR=2,70, p=0,009 e IC=1,29-5,63). Também houve significância para posição -308, na frequência do genótipo G/G (37% vs 24%, OR=2,02, p=0,016 e IC=1,14-3,57) que apresentou associação positiva.

Ainda no que diz respeito ao gene *TNFA* notou-se frequências haplotípicas significativas para os haplótipos GG/GA e GA/AA, apontados como fatores de risco para EM, 37% vs 24% (OR=2,01, p=0,016 e IC=1,14-3,57) e 22% vs 9% (OR=2,90, p=0,005 e IC=1,38-6,11), respectivamente, e para o haplótipo GG/AG, apontado como fator de proteção para a doença, 23% vs 47% (OR=0,33, p=0,0003 e IC=0,18-0,61).

Para o gene *IL6*, posição nt565, ocorreu uma associação positiva para o alelo G (65% vs 54%, OR=1,56, p=0,026 e IC=1,06-2,30) e associação negativa para o alelo A (35% vs 46%, OR=0,63, p=0,026 e IC=0,43-0,93) entre casos e controles. O genótipo G/G (45% vs 32%, OR=1,76, p=0,049 e IC=1,02-3,03) também foi apontado como fator de risco para a doença. O gene ainda apresentou frequência significativa para o haplótipo GG/CG marcando-o como um possível fator de risco para o desenvolvimento da EM, 45% vs 32% (OR=1,76, p=0,0497 e IC=1,02-3,03).

O gene *IL10* apresentou associação significativa para o haplótipo ACC/ACC (39% vs 55%, OR=0,51, p=0,02198 e IC=0,30-0,88), sendo apontado como fator de proteção para

a doença. Como também o haplótipo GCC/ATA (6% vs 1%, OR=10,9, p=0,01489 e IC=1,02-95,5).

Também foi analisada a capacidade de produção de citocinas para os haplótipos dos genes *TGFβ1*, *IL10* e *TNF*, conforme prescrição do kit. Nenhum resultado significativo foi observado entre casos e controles.

#### **4.DISCUSSÃO**

No presente estudo, foram analisados 22 SNPs encontrados em 13 genes de citocinas e seus receptores, buscando possíveis associações entre o perfil polimórfico e suscetibilidade à EM.

A EM é uma doença autoimune que compromete os neurônios devido à destruição da mielina provocada por um processo inflamatório. As causas prováveis são inúmeras: comprometimento das células linfóides no amadurecimento tímico, reações cruzadas, antígenos sequestrados, infecção, superantígenos, exacerbação das células B, regulação Th1, Th2 e Th17. Qualquer um desses fatores que poderiam envolver a causa da doença, exigem a participação de mediadores químicos.

Citocinas são importantes reguladores da resposta inata e adquirida e desempenham um papel crítico no desenvolvimento e na progressão de diversas doenças (Smith e Humphries, 2009).

Em diversos estudos foi constatado que o polimorfismo de genes pode atuar diretamente na transcrição de fatores que regulam o nível sérico desses compostos (Hollegaard e Bidwell, 2006). Dependendo da quantidade e qualidade da citocina produzida é possível prever um prognóstico favorável ou desfavorável ao paciente portador de doença autoimune (Hafler e Flavell, 1996).

Devido a esse quesito é de suma importância associações de fatores de risco ou de proteção relacionados ao polimorfismo de genes de citocinas na suscetibilidade às doenças autoimunes, incluindo a EM, cuja fisiopatologia atribui-se a desregulação da expressão de citocinas pro-e anti-inflamatórias (Wu e Alvarez, 2011).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular possibilitou investigações que associam polimorfismos genéticos localizados em regiões regulatórias de citocinas. Alguns estudos foram realizados em pacientes com outras doenças autoimunes, incluindo artrite reumatóide (Hussein *et al.*, 2013; Lamas *et al.*, 2013), diabetes tipo 1 (Mojtahedi *et al.*, 2006) e lúpus eritematoso sistêmico (Miteva *et al.*, 2012).

Porém, no que diz respeito à EM, diferentes metodologias tem sido empregadas para elucidar o papel de polimorfismos de citocinas na doença, porém não chegou-se a um consenso sobre a ação real dessas mudanças de bases únicas na doença.

Nossos resultados mostram que as variantes polimórficas dos genes  $TNF^{-308, -238}$ ,  $IL4R\alpha^{+1902}$ ,  $IL6^{nt565}$  e  $IL10^{-1082, -819, -592}$  possuem associação com a EM.

O  $TNF-\alpha$  é uma citocina pleotrópica pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e células T que exerce atividades inflamatórias e imunomoduladoras importantes na defesa do hospedeiro. O gene do *TNF* está localizado no cromossoma 6p21.3, na região de classe III do MHC (Major Histocompatibility Complex), entre as regiões de classe II e I e próximos aos genes responsáveis pela produção de linfotoxinas  $\alpha$  e  $\beta$  e proteínas de choque térmico (Smith e Humphries, 2009).

Ruuls e Sedgwick (1999) propuseram que a produção excedente de  $TNF-\alpha$  está relacionada a uma variedade de doenças humanas, incluindo as doenças autoimunes, como a artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn e a EM. Esse fato tem apontado o *TNF* como um gene candidato à predisposição genética para tais doenças. No entanto, devido a sua localização na região do MHC, considerada uma região altamente

polimórfica, que codifica vários genes envolvidos na resposta imunológica, e a existência de um alto grau de desequilíbrio de ligação no local, a observação de que o *TNF* esteja associado a uma doença pode, na verdade, refletir a associação de um outro gene muito próximo ou mesmo situado a alguma distância, mas que faz parte do mesmo haplótipo.

Existem muitos SNPs possíveis para o *TNF*. Na região promotora são: -1031 T/C, -863C/A, -857 C/A, -851 C/T, -419 G/C, -376 G/A, -308 G/A, -238 G/A, -162 G/A e -49 G/A (Hajeer e Hutchinson, 2001). Neste estudo foram analisadas regiões promotoras -308 G/A e -238 G/A.

Para o gene *TNF*, na posição -238, o alelo G foi particularmente mais elevado nos controles. (51% vs 69%, OR=0,46, p=0,0001 e IC=0,31-0,68). Outros achados importantes foram constatados nas frequências genóticas, para o mesmo gene, na posição -308, onde o genótipo G/G foi apontado como sendo capaz de aumentar 2,02 vezes a suscetibilidade para o desenvolvimento de EM (37% vs 24%, OR=2,02, p=0,022 e IC=1,14-3,57) e na posição -238, que mostrou associação negativa para o genótipo G/G (23% vs 47%, OR=0,33, p=0,0004 e IC=0,18-0,61) e associação positiva para o genótipo A/A (22% vs 9%, OR=2,70, p=0,011 e IC=1,29-5,63).

De acordo com a literatura, para o gene *TNF*, a presença da base adenina, na posição -308, é apontada como um fator de risco para EM. Enquanto que a existência da base guanina, é mencionada como fator de proteção. Portanto, a presença do alelo A aumentaria a chance de um indivíduo adquirir a doença e a existência do alelo G diminuiria essa predisposição. (Sarial *et al.*, 2008).

No presente estudo, para o gene *TNF*<sup>-308</sup>, uma nova perspectiva foi enfatizada, mostrando que os pacientes com EM apresentaram maior proporção do alelo G que foi apresentado como fator de risco para a doença. Poderia se argumentar que, neste caso, o resultado simplesmente se deve ao fato de a maior parte dos pacientes não apresentarem a

forma clínica mais agressiva da doença. É possível que pacientes com mais surtos tenham a tendência de apresentar resultados condizentes com o que aponta a literatura. Além disso alguns autores observaram em seus estudos que a frequência do alelo G, para o gene *TNF*<sup>308</sup>, apresenta-se em proporções consideráveis em pacientes portadores de EM quando comparado ao alelo A, o que pode justificar a significância encontrada em nossos resultados (Mihailova *et al.*, 2005; Mirowska-Guzel *et al.*, 2011; Shahbazi, 2011).

Berra *et al.* (2006) em seu estudo, que envolvia estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular, perceberam que a base guanina é a menos suscetível ao neomorfismo químico influenciado por reativos de oxigênio. Devido a isso, confere proteção à molécula de DNA, sendo que sua presença no genoma normal é proporcionalmente maior do que de outras bases nitrogenadas.

Durante o processo de duplicação do DNA, a molécula de guanina normal parecia-se com a citosina. Contudo, a presença de reativos de oxigênio podem influenciar um fenômeno conhecido como transversão de bases, onde a guanina oxidada passa a parear com a base timina. Caso este erro de pareamento não seja corrigido pelas proteínas de reparo, haverá transcrição de um RNA mensageiro alterado que acarretará a tradução de uma proteína defeituosa. Caso esta proteína mutante esteja relacionada aos mecanismos de controle do ciclo celular, a célula poderá desenvolver autonomia proliferativa ou imortalidade, características inerentes às células neoplásicas (Ribeiro *et al.*, 2008). À vista disso, podemos supor que a maior proporção de alelo G encontrado tanto em pacientes quanto nos controles possa ser devido a essa característica própria da molécula de DNA.

Considerando-se ainda a proximidade dos loci do *TNF* e região MHC, a suscetibilidade genética encontrada nesse estudo pode representar associação com o HLA-DR correspondente e não com a citocina. No caso da EM, o haplótipo HLA-DR15 que

confere a maior parte do risco genético para o desenvolvimento da EM (Mäurer et al. 1999).

Por exemplo, associando o desequilíbrio de ligação *TNF* e região MHC com os resultados de pesquisas envolvendo outra doença autoimune, no caso a espondilite anquilosante, foi constatado que os pacientes heterozigotos para HLA-B27 apresentavam o polimorfismo -308 G/G como fator de risco, associado com uma maior porcentagem de células T produtoras de  $TNF-\alpha$  (Rudwaleit et al., 2001).

No entanto, para polimorfismo do gene *TNF*, posição -308, têm sido realizado vários estudos porém, a maioria deles não demonstrou associação relevante com a susceptibilidade à EM ou resultados consistentes, indicando a necessidade de novas investigações (Akcali et al., 2010; Xu et al., 2011).

Nosso estudo apontou que para  $TNF^{-238}$  houve associação significativa para o alelo A (49% vs 31%, OR=2,15, p=0,0001 e IC=1,46-3,15), aumentando 2,15 vezes o risco para EM, em comparação com a associação negativa encontrada para o alelo G (51% vs 69%, OR=0,46, p=0,0001 e IC=0,31-0,68). Assim como apontou o genótipo G/G (23% vs 47%, OR=0,33, p=0,0003 e IC=0,18-0,61), para a mesma posição, como fator de proteção e o genótipo A/A (22% vs 9%, OR=2,70, p=0,009 e IC=1,29-5,63). Como fator de risco para EM.

Amirzargar et al. (2007) analisaram o polimorfismo do gene  $TNF^{-238}$ , em 44 pacientes com EM e 170 controles e encontrou uma associação negativa para o alelo A e para o haplótipo GG/GA. Já Huizinga et al. (1997) verificaram que em pacientes com formas clínicas mais severas de EM a troca da base G para A influenciaria uma maior produção da citocina  $TNF-\alpha$  para polimorfismo na posição -238. Ao correlacionarmos esses dados aos resultados encontrados em nosso estudo percebemos que houve concordância

parcial com o que consta na literatura já que o alelo G apresentou-se como fator de proteção e o alelo A como fator de risco.

O conflito entre os resultados poderia ser parcialmente explicado pelas diferenças étnicas existentes nos pacientes, à heterogeneidade das populações de cada estudo isolado que são formados, por exemplo, por indivíduos EM-PP, EM-RR e EM-SP, e em outros casos, com as formas clínicas mais severas separadamente, que podem acabar sendo mais representativas, como também a interação entre os fatores genéticos e ambientais dos locais de estudo. Ainda podemos citar os estudos com tamanho amostral muito reduzido, o que dificulta a validação dos resultados estatísticos (Xu *et al.*, 2011).

Acreditamos que um estudo que englobe um número maior de pacientes, com características homogêneas, poderia ajudar a solucionar essa dúvida de associação da EM com o polimorfismo para o gene *TNF*.

A IL4 é uma citocina de perfil Th2 de importância decisiva na regulação do equilíbrio entre respostas pró e anti-inflamatórias. A proteína codificada é uma citocina produzida por células T ativadas através de sua ligação no receptor IL4R (Butti *et al.*, 2008).

IL4R é composto por duas subunidades, a  $\alpha$ , que se liga com alta afinidade ao ligante específico, e o  $\gamma$ , comum a outros receptores de citocinas, que é capaz de amplificar o sinal emitido pela subunidade  $\alpha$ . IL4R $\alpha$  é capaz de ligar-se não só a IL4, mas também a IL13 e induz que células efetoras imaturas assumam fenótipo Th2 (Smith e Humphries, 2009).

O gene *IL4R* é encontrado na região cromossômica 16p12.1 e possui um polimorfismo na posição +1902 com a troca de base guanina para adenina, que pode influenciar na expressão das citocinas IL4 e IL13 (Hershey *et al.*, 1997).

No que diz respeito a posição +1902, não foram encontrados estudos com resultados significativos relacionando a mesma com a EM. Entretanto estudos generalizados propõem que a presença do alelo G está associada a genótipos capazes de aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias, induzindo a instalação de um perfil Th2 (Hershey *et al.*, 1997). Corroborando com o resultado apresentado no nosso estudo onde o alelo G apresentou-se como fator de proteção para EM (OR=0,61), sendo assim capaz de colaborar na expressão de citocinas como IL4 e IL13. Também verificou-se que o alelo A (OR=1,61) e o genótipo A/A (OR=1,87) apresentaram uma associação positiva com a doença, ou seja, apresentaram-se como prováveis fatores de risco para o desencadeamento ou progressão da EM. Podemos dizer que nossos dados apresentam-se condizentes com os presentes na literatura, já que um indivíduo com genótipo G/G apresentaria um perfil do tipo Th2, relacionado com a diminuição dos surtos na EM, enquanto um indivíduo com genótipo A/A apresentaria um perfil Th1, relacionado com o desenvolvimento da mesma.

Quirino-Santos *et al.* (2007) não encontraram nenhuma associação entre expressão de polimorfismo nos gene da citocina reguladora para *IL4* e seu receptor *IL4RA* em um estudo caso-controle feito com população brasileira de pacientes portadores de EM e indivíduos saudáveis. Já Brassat *et al.* (2006) observaram dados significativos para o polimorfismo do gene *IL4RA* e a EM, indicaram que o receptor e seu ligante podem ser responsáveis pela suscetibilidade à doença, sendo funcionalmente importantes na cascata de sinalização e nos quadros de remissão.

O gene *IL6* codifica uma citocina produzida principalmente em locais de inflamação aguda e crônica, em que é secretada para o soro e induz uma resposta inflamatória. A citocina IL-6 é induzida pela interação da IL-1 e TNF, já que ambas as citocinas também desempenham efeitos semelhantes nos quadros inflamatórios, bem como na regulação da proliferação celular (Mackay *et al.*, 1993). O funcionamento deste gene



está implicado numa ampla variedade de estados de doença associados com inflamação, incluindo a suscetibilidade a *Diabetes mellitus* e artrite reumatóide (Murakami e Hirano, 2012).

Não foram encontrados estudos na literatura sobre o polimorfismo do gene *IL6* para posição nt565 e progressão da EM. Neste estudo, o alelo G do gene *IL6* na posição nt565 foi correlacionado positivamente com a doença, como também o genótipo *IL6*nt565 G/G mostrou uma associação positiva no limite de significância (45% vs 32%,  $p=0,0497$ ).

O gene é encontrado no braço curto do cromossomo 7 (7p15.3), onde apresenta um forte desequilíbrio de ligação entre os SNPs -174 e nt565 no gene *IL6*, sugerindo que essas mutações não atuam independentemente e sim em conjunto. Portanto, é possível que a associação encontrada, neste estudo para a posição nt565, seja devido a este desequilíbrio de ligação com a posição -174 que apesar de não apresentar valor estatístico relevante nesse estudo, pode ter influenciado no resultado de susceptibilidade encontrado para o alelo G (Terry *et al.*, 2000).

Stoica *et al.* (2010) e Rezaei *et al.* (2010) propuseram que o alelo A no polimorfismo do gene *IL6* posição nt565 influenciaria uma maior produção da citocina IL-6, o alelo G associado ao alelo A representaria um genótipo de produção intermediária e o genótipo G/G seria responsável por baixa produção de IL-6. Sendo assim, o nosso estudo indica que o grupo de pacientes são baixos produtores de IL-6 em comparação com o grupo controle, resultado esse contraditório em relação à importante função inflamatória da IL-6. Porém, levando-se em conta que os resultados de estudos que investigam o papel do gene *IL6* ainda possuem resultados genotípicos variados, faz-se necessária novas investigações.

O gene *IL6* na posição -174 e nt565 apresentou diferenças significativas para o haplótipo GG/CG, marcando-o como um possível fator de risco para o desenvolvimento da

EM. Morse *et al.* (1999) encontraram os genótipos G/G e G/C para posição -174 associados a uma maior produção de IL-6, ao passo que o genótipo C/C estaria associado à menor produção desta citocina no plasma, o que, explica parcialmente o resultado encontrado nesse estudo.

A IL-10 desempenha um papel crítico na regulação imune, predominantemente através da inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios e pode funcionar como um regulador negativo de TNF, ativando a resposta Th2 humoral, com a produção de anticorpos.

O gene *IL10* é encontrado no cromossomo 1, região q32.1. Embora várias modificações polimórficas tenham sido identificadas na região promotora do gene *IL10*, as três posições melhor caracterizadas são -1082, -819 e - 592, devido a sua influência reguladora no sítio de transcrição da citocina (Zhang *et al.*, 2011).

No presente trabalho, para o gene *IL10*, o haplótipo ACC/ACC foi apresentado como fator de proteção (OR=0,46) e o haplótipo GCC/ATA mostrou-se como fator de risco (OR=10,9).

Vários estudos envolvendo a EM como também outras doenças autoimunes abordam que portadores do haplótipo GCC apresentam um aumento na produção de IL-10 plasmática, em comparação com o haplótipo ATA, associado a baixa produção da citocina. Também sugerem que o haplótipo ACC ocasionaria uma produção intermediária da citocina (Almeras, 2002; Wergeland *et al.*, 2005; Smith e Humphries, 2009; Song *et al.*, 2013).

Tais evidências propõem que nossos resultados estão concordantes com os existentes, mesmo ao relacionar como fator de proteção um haplótipo de produção intermediária. Porém, o haplótipo GCC/ATA, mencionado como fator de risco para a EM,

necessita de maior investigação, já que a IL10, sendo uma citocina anti-inflamatória, iria prevenir surtos e não sua promovê-los.

Muitos autores não encontraram associações significativas com quaisquer polimorfismos relacionando o gene da *IL10* com a EM, sugerindo que novas investigações são necessárias (Azarpira *et al.*, 2010; Mirowska-Guzel *et al.*, 2011).

Alguns dos nossos dados confirmaram os resultados de estudos anteriores realizados em outras populações, enquanto outros mostraram-se divergentes e requerem novas investigações. A detecção de um SNP envolvido na etiologia e na fisiopatologia da EM é muito difícil já que é possível que vários polimorfismos genéticos estejam contribuindo para a suscetibilidade ou resistência a EM. É pertinente dizer que a maior limitação encontrada foi a pequena quantidade de dados brasileiros disponíveis, o que não nos permitiu realizar uma comparação dessas associações sem o viés relacionado à etnia. Como sabemos, existem grandes diferenças de frequências de alelos e haplótipos de citocinas nas diversas populações mundiais, e sendo a EM uma doença de caráter multifatorial, sabe-se que diversos fatores genéticos e ambientais podem estar influenciando o seu desenvolvimento. Além disso, alguns estudos estratificaram as formas clínicas analisando-as em separado, o que pode contribuir para a divergência dos dados quando associações são realizadas em formas mais graves da doença. Diante do exposto, podemos observar que ainda há muito para ser pesquisado em relação a associações entre polimorfismos genéticos de genes de citocinas e a EM.

## REFERÊNCIAS

- Akcali A, Pehlivan S, Pehlivan M, Server T, Akqul P, Neyal M. TNF-alpha promoter polymorphisms in multiple sclerosis: no association with -308 and -238 alleles, but the -857 alleles in associated with the disease in Turkish patients. *Int J immunogenet.* 2010; 37:91-95.
- Almeras L, Meresse B, Seze J, De Lefranc D, Dubucquoi S, Fajardy I, Vermersch P, Prin L. Interleukin-10 promoter polymorphism in multiple sclerosis: association with disease progression. *Eur Cytokine Netw.* 2002; 13:200-206.
- Amirzargar A, Khosravi F, Dianat S, Hushmand F, Maryousef P, Foroushani AR, Lofti J, Nikbin B. Profile of cytokine gene polymorphisms in Iranian multiple sclerosispatients. *Mult Scler.* 2007; 13: 253-255.
- Azarpira N, Borhani Haghghi A, Pourjafar M, Shariat A. Interleukin 10 gene polymorphism in Iranian patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Taiwan.* 2010; 19:107-111.
- Berra CM, Menck CFM, Di Macio P. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. *Quím. Nova.* 2006; 29: 1340-1344.
- Brassat D, Motsinger AA, Caillier SJ, Erlich HA, Walker K, Steiner LL, Cree BA, Barcelos LF, Pericak-Vance MA, Schmidt S, Gregory S, Hauser SL, Haines JL, Oksenberg JR, Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction reveals gene-gene interactions associated with multiple sclerosis susceptibility in African Americans. *Genes Immun.* 2006; 7:310-315.
- Butti E, Bergami A, Recchia A, Brambilla E, Del Carro U, Amadio S, Cattalini A, Esposito M, Stornaiuolo A, Comi G, Pluchino S, Mavilio F, Martino G, Furlan R. IL4 gene delivery to the CNS recruits regulatory T cells and induces clinical recovery in mouse models of multiple sclerosis. *Gene Ther.* 2008; 15:504-515.
- Cardozo DM, Guelsin GA, Clementino SL, Melo FC, Braga MA, Souza CD, Moliterno RA, Visentainer JE. DNA extraction from coagulated human blood for application in genotyping techniques for human leukocyte antigen and immunoglobulin-like receptors. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009; 42:651-656.
- Chen SJ, Wang YL, Fan HC, Lo WT, Wang CC, Sytwu HK. Current status of the immunomodulation and immunomediated therapeutic strategies for multiple sclerosis. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 1-16.
- Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA. Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J. Clin. Immunol.* 2008; 28: 697-706.

Eixarch H, Mansilla MJ, Costa C, Kunkel SL, Montalban X, Godessart N, Espejo C. Inhibition of delta-like ligand 4 decreases Th1/Th17 response in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2013; 541:161-166.

Hafler DA, Flavell R. Autoimmunity. How to know thy self. *Curr Opin Immunol*. 1996; 8: 805-807.

Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol*. 2001; 62:1191-1199.

Heidari M, Behmanesh M, Sahraian MA. Variation in SNPs of the IL7RA gene is associated with multiple sclerosis in the Iranian population. *Immunol. Invest*. 2011; 40: 279-289.

Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the  $\alpha$  subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med*. 1997; 337:1720-1725.

Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun*. 2006; 7:269-276.

Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, Van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, Van Oosten BW, Polman CH, Penã AS. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*. 1997; 72: 149-153.

Hussein YM, Mohamed RH, El-Shahawy EE, Alzahrani SS. Interaction between TGF- $\beta$ 1 (869C/T) polymorphism and biochemical risk factor for prediction of disease progression in rheumatoid arthritis. *Gene*. 2013; 536:393-397.

Imitola J, Chitnis T, Khoury JS. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol. Ther*. 2005; 106: 163-177.

Javor J, Bucova M, Ferencik S, Grosse-Wilde H, Buc M. Single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in the healthy Slovak population. *Int. J. Immunogenet*. 2007; 34: 273-280.

Johnson VJ, Yucesoy B, Luster, MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine*. 2004; 24: 135-141.

Karimabad MN, Arababadi MK, Hakimizadeh E, Daredori HY, Nazari M, Hassanshahi G, Kennedy D. Is the IL-10 promoter polymorphism at position -592 associated with immune system-related diseases? *Inflammation*. 2013; 36: 35-41.

Lamas JR, Rodriguez-Rodriguez L, Tornero-Esteban P, Villafuertes E, Hoyas J, Abasolo L, Varadé J, Alvarez-Lafuente R, Urcelay E, Fernández-Gutiérrez B. Alternative splicing and proteolytic rupture contribute to the generation of soluble IL-6 receptors (sIL-6R) in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2013; 61:720-723.

Libbey JE, Cusick MF, Fujinami RS. Role of pathogens in multiple sclerosis. *Int. Rev. Immunol.* 2013.

Mackay F, Loester H, Stueber D, Gehr G, Les-slaur W. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med*. 1993; 177:1277-1286.

Mäurer M, Kruse N, Giess R, Kyriallis K, Toyka KV, Rieckmann P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha promoter is not associated with disease progression in multiple sclerosis patients. *J Neurol*. 1999; 246:949-954.

Mihailova S, Ivanova M, Mihaylova A, Quin L, Mikova O, Naumova E. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2005; 168:138-143.

Mirowska-Guzel D, Gromadzka G, Mach A, Czlonkowski A, Czlonkowska A. Association of IL1A, IL1B, ILRN, IL6, IL10 and TNF- $\alpha$  polymorphisms with risk and clinical course of multiple sclerosis in a Polish population. *J Neuroimmunol*. 2011; 236:87-92.

Miteva LD, Manolova IM, Ivanova MG, Rashkov RK, Stoilov RM, Gulubova MV, Stanilova SA. Functional genetic polymorphisms in interleukin-12B gene in association with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2012; 32:53-59.

Mojtahedi Z, Naeimi S, Farjadian S, Omrani GR, Ghaderi A. Association of IL-18 promoter polymorphisms with predisposition to Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2006; 23:235-239.

Morse HR, Olomolaiye OO, Wood NA, Keen LJ, Bidwell JL. Induced heteroduplex genotyping of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 polymorphisms associated with transcriptional regulation. *Cytokine*. 1999; 11:789-795.

Murakami M, Hirano T. The pathological and physiological roles of IL-6 amplifier activation. *Int J Biol Sci*. 2012; 8:1267-1280.

Quirico-Santos T, Suppiah V, Heggarty S, Caetano R, Alves-Leon S, Vandebroek K. Study of polymorphisms in the interleukin-4 and IL-4 receptor genes in a population of Brazilian patients with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2007; 65: 15-19.

Rezaei N, Aghamohammadi A, Mahmoudi M, Shakiba Y, Kardar GA, Mahmoudi M, Moradi B, Amirzargar AA. Association of IL-4 and IL-10 gene promoter polymorphisms with common variable immunodeficiency. *Immunobiology*. 2010; 215:81-87.

Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DDC, Arçari DP, Pedrazzoli Júnior J, Martinez CAR. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2008; 7:267-72.

Rudwaleit M, Siebert S, Yin Z, Eick J, Thiel A, Radbruch A, Sieper J, Braun J. Low T cell production of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF -308 gene polymorphism. *Ann Rheum Dis*. 2001; 60:36-42.

Ruuls, S. R., Sedgwick, J. D. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. *Am. J. Hum. Genet*. 1999; 65: 294-301.

Salou M, Elong Ngonon A, Garcia A, Michel L, Laplaud DA. Adaptive immunity and pathophysiology of multiple sclerosis. *Rev Med Interne*. 2013; 34: 479-486.

Sarial S, Shokrgozar MA, Amirzargar A, Shokri F, Radfar J, Zohrevand P, Arjang Z, Sahraian MA, Lotfi J. IL-1, IL-1R and TNF $\alpha$  gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2008; 7: 37-40.

Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20:43-59.

Song GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Hum Immunol*. 2013; 74:364-370.

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol*. 2005; 23: 683-747.

Stoica AL, Stoica E, Constantinescu I, Uscatescu V, Ginhina C. Interleukin-6 and interleukin-10 gene polymorphism, endothelial dysfunction, and postoperative prognosis in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2010; 52:103-109.

Szolnoki Z, Kondacs A, Mandi Y, Somogyvari. Characteristic imprint of single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis. *J. Mol. Neurosci*. 2009; 38:166-172.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2000; 275:18138-18144.

Vandenbroeck K. Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies. *J. Interferon Cytokine Res*. 2012; 32: 134-151.

Wergeland S, Beiske A, Nyland H, Hovdal H, Jensen D, Larsen JP, Maroy TH, Smievoll AI, Vedeler CA, Myhr KM. IL-10 promoter haplotype influence on interferon treatment response in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2005; 12:171-175.

Wu GF, Alvarez E. The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2011; 29:257-278.

Xu L, Yuan W, Sun H, Zhang X, Jia X, Shen C, Zhao Y, Sun D, Yu Y, Jin Y, Fu S. The polymorphisms of the TNF- $\alpha$  gene in multiple sclerosis?--a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2011, 38:4137-4144.

Zhang YM, Wu N, Yang L, Zhang J, Sun X, Zhong S, Ma X, Wang Y. Study on the T-helper cell 1/2 cytokine profile in blister fluid of patients with herpes zoster and its clinical significance. *J Dermatol.* 2011; 38:1158-1162.



**TABELAS**

Tabela 1. Frequências das variáveis qualitativas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Variável	Pacientes EM (n=82)		Controles (n=170)		p - valor
	n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%	
Gênero	Feminino		Feminino		ns
	61	74,3	110	64,7	
	Masculino		Masculino		ns
	21	25,7	60	35,3	
Forma Clínica	Remitente recorrente				na
	61	74			
	Primária progressiva				
	8	10			
	Secundária progressiva				na
4	5				
	Não identificada				na
9	11				
Grupo étnico	Caucasiano		Caucasiano		ns
	69	80	136	84	
	Não caucasiano		Não caucasiano		ns
13	16	34	20		

p= teste exato de Fisher; na= não apresenta; ns= não significativa

Tabela 2. Frequências alélicas dos genes de citocinas e receptores de citocinas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Gene	dbSNP	Alelos	Pacientes EM (2n=82)		Controles (2n=170)		p - valor	OR	IC 95%
			n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
<i>IL1A</i>	-889	C	117	71	256	75	ns		
		T	47	29	84	25			
<i>IL1B</i>	-511	C	105	64	204	60	ns		
		T	59	36	136	40			
	3962	C	123	75	260	76	ns		
		T	41	25	80	24			
<i>IL1R</i>	pst1 1970	C	115	70	217	64	ns		
		T	49	30	123	36			
<i>IL1RA</i>	mspa1 11100	C	38	23	101	30	ns		
		T	126	77	239	70			
<i>IL4RA</i>	1902	A	134	82	249	73	0.044	1.63	1.03 - 2.61
		G	30	18	91	27	0.044	0.61	0.38 - 0.97
<i>IL12</i>	-1185	A	113	69	236	69	ns		
		C	51	31	104	31			
<i>IFNG</i>	874	A	92	56	186	55	ns		
		T	72	44	154	45			

p= teste exato de Fisher; OR= *Odds Ratio*; ns= não significativo; IC 95%= intervalo de confiança 95%

Tabela 2. Frequências alélicas dos genes de citocinas e receptores de citocinas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Gene	dbSNP	Alelos	Pacientes EM (2n=82)		Controles (2n=170)		p - valor	OR	IC 95%
			n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
<i>TGFB1</i>	Codon 10	C	76	46	158	46	ns		
		T	88	54	182	54			
	Codon 25	C	54	33	132	39	ns		
		G	110	67	208	61			
<i>TNF</i>	-308	A	67	41	164	48	ns		
		G	97	59	176	52			
	-238	A	81	49	106	31	0.0001	2.15	1.46 - 3.15
		G	83	51	234	69	0.0001	0.46	0.31 - 0.68
<i>IL2</i>	-330	G	59	36	134	39	ns		
		T	105	64	206	61			
	166	G	116	71	223	66	ns		
		T	48	29	117	34			

p= teste exato de Fisher; OR= *Odds Ratio*; ns= não significativo; IC 95%= intervalo de confiança 95%

Tabela 2. Frequências alélicas dos genes de citocinas e receptores de citocinas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Gene	dbSNP	Alelos	Pacientes EM (2n=82)		Controles (2n=170)		p - valor	OR	IC 95%
			n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
<i>IL4</i>	-1098	G	52	32	101	30	ns		
		T	112	68	239	70			
	-590	C	89	54	172	51	ns		
		T	75	46	168	49			
	-33	C	71	43	154	45	ns		
		T	93	57	186	55			
<i>IL6</i>	-174	C	86	52	177	52	ns		
		G	78	48	163	48			
	nt565	A	58	35	157	46	0.026	0.63	0.43 - 0.93
		G	106	65	183	54	0.026	1.56	1.06 - 2.30
<i>IL10</i>	-1082	A	137	83	303	89	ns		
		G	27	17	37	11			
	-819	C	136	83	301	88	ns		
		T	28	17	39	12			
	-592	A	28	17	38	11	ns		
		C	136	83	302	89			

p= teste exato de Fisher; OR= *Odds Ratio*; ns= não significativo; IC 95%= intervalo de confiança 95%

Tabela 3. Frequências genótípicas dos genes de citocinas e de receptores de citocinas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Gene	SNP	Genótipo	Pacientes EM (n=82)		Controles (n=170)		p - valor	OR	IC 95%
			n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
IL1A	[-889 T/C]	T:T	7	9	11	7	ns		
		T:C	33	40	62	36	ns		
		C:C	42	51	97	57	ns		
IL1B	[-511 C/T]	C:C	32	39	60	35	ns		
		C:T	41	50	84	49	ns		
		T:T	9	11	26	16	ns		
IL1R	[+3962 T/C]	T:T	7	8	9	6	ns		
		T:C	27	33	62	36	ns		
		C:C	48	59	99	58	ns		
IL1R	[1970 C/T]	C:C	40	49	19	11	ns		
		C:T	35	43	63	37	ns		
		T:T	7	8	88	52	ns		

p= teste exato de Fisher; OR= *Odds Ratio*; ns= não significativo; IC 95%= intervalo de confiança 95%

Tabela 3. Frequências genótípicas dos genes de citocinas e de receptores de citocinas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Gene	SNP	Genótipo	Pacientes EM (n=82)		Controles (n=170)		p - valor	OR	IC 95%
			n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
IL1RA	[11100 T/C]	T:T	49	60	88	52	ns		
		T:C	28	34	63	37	ns		
		C:C	5	6	19	11	ns		
IL4RA	[+1902 G/A]	G:G	4	5	12	7	ns		
		G:A	22	27	67	39	ns		
		A:A	56	68	91	54	0.029	1.87	1.07 - 3.25
IL12	[-1188 C/A]	C:C	6	7	16	9	ns		
		C:A	39	48	72	43	ns		
		A:A	37	45	82	48	ns		
GIFN	[+874 A/T]	A:A	27	36	53	31	ns		
		A:T	38	46	80	47	ns		
		T:T	17	21	37	32	ns		

p= teste exato de Fisher; OR= *Odds Ratio*; ns= não significativo; IC 95%= intervalo de confiança 95%

Tabela 3. Frequências genotípicas dos genes de citocinas e de receptores de citocinas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Gene	SNP	Genótipo	Pacientes EM (n=82)		Controles (n=170)		p - valor	OR	IC 95%
			n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
TGFB1	[ <i>cd 10 C/T</i> ]	C:C	18	22	37	22	ns		
		T:C	40	49	84	49	ns		
		T:T	24	29	49	29	ns		
	[ <i>cd 25 G/C</i> ]	G:G	34	42	64	38	ns		
		G:C	42	51	80	47	ns		
		C:C	6	7	26	15	ns		
TNF	[ <i>-308 G/A</i> ]	G:G	30	37	40	24	0.016	2.02	1.14 - 3.57
		G:A	37	45	96	56	ns		
		A:A	15	18	34	20	ns		
	[ <i>-238 G/A</i> ]	G:G	19	23	80	47	0.0003	0.33	0.18 - 0.61
		G:A	45	55	74	44	ns		
		A:A	18	22	16	9	0.009	2.70	1.29 - 5.63
IL2	[ <i>-330 T/G</i> ]	T:T	32	39	55	32	ns		
		T:G	41	50	91	54	ns		
		G:G	7	11	24	14	ns		
	[ <i>+166 G/T</i> ]	G:G	38	49	72	42	ns		
		G:T	40	46	79	46	ns		
		T:T	4	5	19	11	ns		

p= teste exato de Fisher; OR= *Odds Ratio*; ns= não significativo; IC 95%= intervalo de confiança 95%

Tabela 3. Frequências genóticas dos genes de citocinas e de receptores de citocinas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Gene	SNP	Genótipo	Pacientes EM (n=82)		Controles (n=170)		p - valor	OR	IC 95%
			n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
IL4	[-1098 T/G]	T:T	39	48	83	49	ns		
		T:G	34	41	73	43	ns		
		G:G	9	11	14	8	ns		
	[-590 T/C]	T:T	15	18	36	21	ns		
		T:C	45	55	98	58	ns		
		C:C	22	27	36	21	ns		
	[-33 T/C]	T:T	30	37	57	34	ns		
		T:C	33	4	72	42	ns		
		C:C	19	23	41	24	ns		
IL6	[-174 G/C]	G:G	14	17	34	2	ns		
		G:C	50	61	95	56	ns		
		C:C	18	22	41	24	ns		
	[nt565 G/A]	G:G	37	45	54	32	0.049	1.76	1.02 - 3.03
		G:A	32	39	75	44	ns		
		A:A	13	16	41	24	ns		

p= teste exato de Fisher; OR= *Odds Ratio*; ns= não significativo; IC 95%= intervalo de confiança 95%



Tabela 3. Frequências genótípicas dos genes de citocinas e de receptores de citocinas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Gene	SNP	Genótipo	Pacientes EM (n=82)		Controles (n=170)		p - valor	OR	IC 95%
			n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
IL10	[-1082 G/A]	A:A	55	67	133	78	ns		
		G:A	27	33	37	22	ns		
	[-819 C/T]	C:C	54	66	131	77	ns		
		C:T	28	34	39	23	ns		
	[-592 C/A]	C:C	54	66	132	78	ns		
		C:A	28	34	38	22	ns		

p= teste exato de Fisher; OR= *Odds Ratio*; ns= não significativo; IC 95%= intervalo de confiança 95%

Tabela 3. Frequências haplotípicas dos genes de citocinas entre indivíduos portadores de esclerose múltipla e controles.

Gene	Haplótipo	Pacientes EM (2n=164)		Controles (2n=340)		p - valor	OR	IC 95%
		n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
TNF	GG/GA	60	37	80	24	0.016	2.01	1.14 - 3.57
	GA/AA	36	22	30	8	0.005	2.90	1.38 - 6.11
	GG/AG	38	23	160	47	0.0003	0.33	0.18-0.61
IL10	GCC/ATA	10	6	2	1	0.01489	10.9	1.02 - 95.5
	ACC/ACC	64	39	188	55	0.02198	0.51	0.30 - 0.88
IL6	GG/CG	74	45	108	32	0.0497	1.76	1.02 - 3.03

p= teste exato de Fisher; OR= *Odds Ratio.*, IC 95%= intervalo de confiança 95%

### 3. CAPÍTULO III

#### 3.1 CONCLUSÕES

- ✓ Neste estudo, após comparação de frequências de SNPs de citocinas de pacientes com EM e um grupo controle, Foi atribuída influência significativa, nos genes de citocinas pró-inflamatórias *TNF*<sup>-308, -238</sup> (GG/GA, GA/AA e GG/AG)<sup>-238</sup> (G/G, A/A, G e A)<sup>-308</sup> (G/G), *IL6*<sup>-174, nt565</sup>(GG/CG)<sup>nt565</sup> (G/G e G) e anti-inflamatórias *IL4RA*<sup>+1902</sup>(A/A, A e G) e *IL10*<sup>-1082, -819, -592</sup> (GCC/ATA e ACC/ACC) sugerindo uma ação na predisposição ou proteção à EM.
- ✓ PRÓ-INFLAMATÓRIA:*TNF* apresentou associações para ambos os SNPs analisados. Na posição -238, ocorreu uma associação negativa para G e G/G. Em contraste, A/A apresentou associação positiva. Para a posição -308, G/G apresentou associação positiva. Os haplótipos GG/GA e GA/AA podem ser fortes candidatos a fatores de risco para a doença. No entanto, o haplótipo GG/AG mostrou-se um candidato a fator neuroprotetor. O polimorfismo do gene da *IL6*<sup>nt565</sup> mostrou associação positiva para G e G/G e para o haplótipo GG/CG, marcando-o como um possível fator de risco para o desenvolvimento da condição patológica.
- ✓ ANTII-INFLAMATÓRIAS: Foi identificada uma associação negativa para o gene *IL4RA*<sup>+1902</sup>, no alelo G, indicando efeito protetor no desenvolvimento da doença. Enquanto A/A apresentou uma associação positiva, o que sugere que esse genótipo pode atuar como um fator genético de predisposição. A associação positiva encontrada nos SNPs *IL10*<sup>-1082, -819, -592</sup>, para o haplótipo ACC/ACC, aponta-os como fatores de proteção.
- ✓ Não foram encontradas associações significativas para: *IL1A*<sup>-889</sup>, *IL1B*<sup>-511,+3962</sup>, *IL1R*<sup>1970</sup>, *IL1RA*<sup>11100</sup>, *IL12*<sup>-1188</sup>, *IFNG*<sup>+874</sup>, *TGFBI*<sup>códon 10, códon 25</sup>, *IL2*<sup>-330, +166</sup>, *IL4*<sup>-1098, -590, -33</sup> e *IL6*<sup>-174</sup>.

### 3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo possibilitou não só a identificação de fatores de risco ou proteção, mas auxiliou na compreensão da fisiopatologia da esclerose múltipla como uma doença autoimune. Estudos direcionados para a investigação de variantes polimórficas de citocinas podem estimular novas perspectivas de tratamento, com mecanismos de ação mais abrangentes do que o controle da inflamação, já que se estimuladas estas substâncias poderiam desempenhar um papel no controle da fase degenerativa da doença.

É possível investigar a interação desses genes reguladores com outros marcadores genéticos, como os genes KIR (*killer cell immunoglobulin-like*) e MICA, assim como analisar o papel das vias de sinalização e seus genes e as linhagens celulares autorreativas através da citometria de fluxo, dentre outros.

Além disso, realizar estudos que englobem outras citocinas não contempladas pelo kit utilizado no estudo, podem ser promissores para elucidar os mecanismos envolvidos na doença.