

FREQUÊNCIA ALÉLICA E GENOTÍPICA DO SNP -589C>T DO GENE DA IL-4 EM UMA SUBAMOSTRA DE 1.146 INDIVÍDUOS DA COORTE DE 1993 ESTRATIFICADA SEGUNDO A COR DA PELE AUTORREFERIDA

TESSMANN, Josiane Weber¹; CRUZ, Otávio Martins²; SILVA, Liziane Pereira da³; WAGNER, Mônica Silveira⁴; OLIVEIRA, Isabel Oliveira de⁵

¹ Acadêmica de Biotecnologia – UFPEL <josiwt@hotmail.com>

² Mestrando do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – UFPEL <otavio_cruz@hotmail.com.br>

³ Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – UFPEL <lizibio@yahoo.com.br>

⁴ Acadêmica de Ciências Biológicas - UFPEL <monikinhaw@hotmail.com>

⁵ Instituto de Biologia <olivia@terra.com.br>

Laboratório de Fisiologia Molecular - Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica respiratória, de caráter complexo, que envolve a interação de fatores genéticos e ambientais (CASAGRANDE et al., 2008), acomete cerca de 235 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2011). Clinicamente a asma cursa com inflamações alérgicas, caracterizada pelo aumento da interleucina-4 (IL-4) a qual é secretada por linfócitos T helper tipo 2 (Th2) (GARCIA et al., 2005). Esta citocina atua nos linfócitos B, induzindo a mudança de isotipo para imunoglobulina E (IgE), além de promover a diferenciação de células T em células Th2 (STEINKE e BORISH, 2001).

O gene da IL-4, localizado no cromossomo 5q11, apresenta polimorfismos associados ao aumento dos níveis séricos totais de IgE e, potencialmente, com asma, o que tem sido relatado em estudos realizados em diferentes etnias (BASEHORE et al., 2004). Dentre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) descritos na literatura, tem-se o SNP -589C>T (rs2243250) que corresponde à substituição de uma base C por uma base T. Está localizado na região promotora do gene e parcialmente controla a produção de IL-4 (ROSENWASSER et al., 1995).

A coorte de 1993 representa um estudo de ciclo vital que inclui 5.265 crianças nascidas vivas nos hospitais da zona urbana da cidade de Pelotas-RS, Brasil, no ano de 1993 (VICTORA et al., 2008). Em 2008, um novo acompanhamento desta coorte foi realizado para aquisição de diferentes dados, além de coleta de saliva para a criação de um banco de DNA da coorte de 93.

O presente estudo teve por objetivo descrever a frequência alélica e genotípica do SNP -589C>T no gene da IL-4 em uma subamostra de 1.146 adolescentes da coorte de nascimentos de 1993.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No acompanhamento de 2008, 4.297 adolescentes pertencentes ao estudo de Coorte dos nascidos vivos em 1993 compareceram a uma central de medidas no Centro de Pesquisa em Saúde Dr. Amílcar - UFPEL, para a realização de medidas antropométricas, clínicas e de função pulmonar. Dentre estes, 4.110 coletaram saliva através do kit comercial Oragene (Oragene®•DNA sample collection kit) para

extração de DNA, o qual após processado foi armazenado à -20°C até sua utilização. A presente análise de polimorfismos foi realizada através de parceria entre o Laboratório de Fisiologia Molecular-IB-UFPEL, o Grupo de Pesquisa em Oncologia - CDTEC-UFPEL e o Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento-FAEM-UFPEL.

A preparação das amostras de DNA incluiu uma etapa de leitura das concentrações das amostras através do equipamento NanoVue, seguida de diluição com TE, a fim de obter uma concentração final de $20\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$.

A genotipagem das amostras foi realizada em 27% das amostras ($N=1.146$) através da técnica de discriminação alélica com uso de sondas TaqMan® do tipo MGB (Minor Groove Binding), pré-desenhadas pela Applied Biosystems. Duas sondas foram usadas, uma marcada com o fluoróforo repórter FAM®, que foi utilizada para detectar o alelo T, e a outra marcada com o fluoróforo repórter VIC®, para detectar o alelo C. A análise do polimorfismo foi realizada por gráficos de *clusters* gerados pelo equipamento Real Time ABI 7.500Fast, da seguinte forma: maior fluorescência emitida pela sonda marcada com FAM® corresponde ao homozigoto mutado TT, maior fluorescência emitida pela sonda marcada com VIC® indica homozigoto selvagem CC, emissão de ambas as fluorescências remete ao heterozigoto CT.

A digitação dos resultados foi realizada em duplicata, gerando dois bancos de dados. A seguir foi feita a consolidação destes obtendo-se um banco final corrigido.

Os resultados foram analisados pelo Teste Qui-quadrado, e os dados obtidos foram avaliados com o programa STATA 10.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência alélica observada na subamostra foi de 0,74 para o alelo C e 0,26 para o alelo T. A frequência genotípica encontrada foi de 56,02% ($n=642$) para o genótipo CC, 35,78% ($n=410$) para o genótipo CT e 8,20% ($n=94$) para o genótipo TT. Os genótipos do polimorfismo -589C>T do gene da IL-4 na subamostra estudada não se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 5,99$).

Após a análise estratificada por cor da pele autorreferida pelos indivíduos, as frequências alélicas (Tab. 1) e genotípicas (Tab. 2) apresentaram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg: brancos ($\chi^2=0,002$); pretos ($\chi^2 =1,97$); pardos ($\chi^2=0,002$); índios ($\chi^2=0,30$) e amarelos ($\chi^2=0,30$), sugerindo a ocorrência de casamentos assortativos dentro da população, corroborando resultados de estudos demográficos previamente publicados (PENNA et al., 2011; PETRUCCELLI, 2001).

Tabela 1 - Frequência alélica do polimorfismo 589C>T do gene da IL-4 em uma subamostra da coorte de 1993, estratificada por cor da pele.

Cor da pele	Alelo C	Alelo T
Branco	0,81	0,19
Preto	0,53	0,47
Pardo	0,68	0,32
Indígena	0,71	0,29
Amarelo	0,71	0,29

Tabela 2 – Frequência genotípica do polimorfismo 589C>T do gene da IL-4 em uma subamostra da coorte de 1993, estratificada por cor da pele.

Cor da Pele	Genótipo CC	Genótipo CT	Genótipo TT
Branco	65,54% (n=483)	30,80% (n=227)	3,66% (n=27)
Preto	30,29% (n=53)	44,57% (n=78)	25,14% (n=44)
Pardo	45,50% (n=91)	44,00% (n=88)	10,50% (n=21)
Amarelo	47,06% (n=8)	47,06% (n=8)	5,88% (n=1)
Indígena	47,06% (n=8)	47,06% (n=8)	5,88% (n=1)

*n: número total de indivíduos

4. CONCLUSÃO

A descrição das frequências alélicas e genotípicas do SNP -589C>T do gene da IL-4 em uma subamostra de indivíduos do estudo de coorte de nascidos vivos em 1993 em Pelotas, representa um avanço na descrição de genes de interesse. Isto permite a inserção de dados da nossa população junto ao cenário mundial, buscando investigar associações gene-ambiente envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos de doenças complexas, tais como a asma.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado para a distribuição dos genótipos somente quando os dados são agrupados segundo a cor da pele, sugere a ocorrência de casamentos não aleatórios dentro da população estudada.

Pretendemos confirmar nossos resultados de genotipagem através de sequenciamento de 1% das amostras, além de investigar a ancestralidade desses diferentes grupos de indivíduos, afim de melhor compreender nossos achados.

5. REFERÊNCIAS

BASEHORE, M. J.; HOWARD, T. D.; LANGE, L. A.; MOORE, W. C.; HAWKINS, G. A.; MARSHIK, P.L.; HARKINS, M. S.; MEYERS, D. A.; BLEECKER, E. R. A comprehensive evaluation of *IL4* variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, p. 80 – 87, 2004.

CASAGRANDE, R. R. D.; PASTORINO, A. C.; SOUZA, R. G. L.; LEONE, C.; SOLÉ, D.; JACOB, C. M. A. Prevalência de asma e fatores de risco em escolares da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 3, 2008.

GARCÍA, M. I.; DÁVILA, I.; LAFFOND, E.; MORENO, E.; LORENTE, F.; SARMIENTO, R. G. Interleukin-4 (*IL4*) and Interleukin-4 receptor (*IL4RA*) polymorphisms in asthma: a case control study. **Clinical and molecular allergy**, v. 3, 2005.

PENA, S. D. J.; DI PIETRO, G.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J.P.; HUTZ, M.H.; et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **Plos one**, v. 6, (2): e17063, 2011.

PETRUCCELLI, J.L. Seletividade por cor e escolhas conjugais no Brasil dos 90. **East Afro-Asiát**, p. 29-51, 2001.

ROSENWASSER, L. J.; KLEMM, D. J.; DRESBACK, J. K.; INAMURA, H.; MASCALI, J. J.; KLINNERT, M.; BORISH, L. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 25, p. 74-78, 1995.

STEINKE, J. W.; BORISH, L. Th2 cytokines and asthma interleukin-4: Its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. **Respiratory Research**, p.66-70, 2001.

VICTORA, C. G.; HALLAL, P. C.; ARAÚJO, C. L. P.; MENEZES, A. M. B.; WELLS, J. C. K.; BARROS, C. B. Cohort Profile: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. **International Journal of Epidemiology**, p. 704 – 709, 2008.

WHO – World Health Organization. Disponível em: <
<http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>>. Acesso em: 02 de agosto de 2011.