

Polimorfismo do gene IL1B - 511 (rs16944) em pacientes brasileiros diagnosticados com acidente vascular encefálico hemorrágico

IL1B - 511 gene polymorphism (rs16944) in Brazilian patients diagnosed with haemorrhagic stroke

Polimorfismo del gen IL1B - 511 (rs16944) en pacientes brasileños diagnosticados con accidente cerebrovascular hemorrágico

Gilson Luiz de Carvalho Lopes Filho¹, Aline Ribeiro Barros², Helia Carla Souza³, Daniel Oliveira Freire¹,
Luzitano Brandão Ferreira³, Izabel Cristina Rodrigues da Silva²

Como citar: Lopes Filho GLC, Barros AR, Souza HC, Freire DO, Ferreira LB, Silva ICR. Polimorfismo do gene IL1B - 511 (rs16944) em pacientes brasileiros diagnosticados com acidente vascular encefálico hemorrágico. REVISIA. 2020; 9(1): 24-9. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v9.n1.p24a29>

REVISA

1. Faculdade LS. Taguatinga, Distrito Federal, Brasil.

2. Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

3. Centro Universitário de Brasília. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Recebido: 15/10/2019
Aprovado: 15/12/2019

RESUMO

Objetivo: aferir a possível relação do polimorfismo IL1B (-511 C/T) com o prognóstico do AVEH. **Método:** Para avaliar este questionamento, usou-se uma amostra de 81 indivíduos diagnosticados com AVEH, na qual passaram por análise do polimorfismo IL1B -511 C/T, pela técnica da PCR-RFLP. A análise estatística adotou um nível de significância de 5%. **Resultados:** a pesquisa mostrou que a presença dos genótipos CC ou CT/TT não resultam uma associação estatística entre o polimorfismo da IL1B com o aparecimento do AVEH (P= 0,174). **Conclusão:** O estudo demonstrou que a variação de C e T no polimorfismo do gene rs16944 não está associada com os aspectos clínicos selecionados. Também mostrou não haver associação estatística com a manifestação da doença e a variação genotípica. **Descritores:** Interleucina-1; AVEH; Polimorfismo Genético.

ABSTRACT

Objective: To assess the possible relationship between IL1B (-511 C / T) polymorphism and the prognosis of HS. **Method:** To evaluate this questioning, we used a sample of 81 individuals diagnosed with HS, who underwent analysis of the IL1B-511 C / T polymorphism by the PCR-RFLP technique. Statistical analysis adopted a significance level of 5%. **Results:** Research has shown that the presence of CC or CT / TT genotypes does not result in a statistical association between IL1B polymorphism and the appearance of HS (P = 0.174). **Conclusion:** The study demonstrated that C and T variation in rs16944 gene polymorphism is not associated with the selected clinical aspects. It also showed no statistical association with disease manifestation and genotypic variation. **Descriptors:** Interleukin-1; HS; Genetic polymorphism.

RESUMEN

Objetivo: evaluar la posible relación entre el polimorfismo IL1B (-511 C / T) y el pronóstico de AVEH. **Método:** Para evaluar este cuestionamiento, utilizamos una muestra de 81 individuos diagnosticados con AVEH, que se sometieron a análisis del polimorfismo IL1B-511 C / T mediante la técnica PCR-RFLP. El análisis estadístico adoptó un nivel de significación del 5%. **Resultados:** La investigación ha demostrado que la presencia de genotipos CC o CT / TT no da como resultado una asociación estadística entre el polimorfismo IL1B y la aparición de AVEH (P = 0.174). **Conclusión:** El estudio demostró que la variación de C y T en el polimorfismo del gen rs16944 no está asociada con los aspectos clínicos seleccionados. Tampoco mostró asociación estadística con la manifestación de la enfermedad y la variación genotípica. **Descritores:** Interleucina-1; AVEH; Polimorfismo Genético.

Introdução

As Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) tornaram-se com o passar dos anos a principal causa de morte da população em geral, tomando o lugar que outrora pertenceu as doenças infectocontagiosas. A ciência tem acompanhado essa tendência, e cada vez mais é comum os estudos a respeito dos fatores preditivos diversos para essas patologias. Dentre as DCNT pode-se destacar as doenças do aparelho circulatório, que são responsáveis em média por 30% das mortes no Brasil.¹ O Acidente Vascular Encefálico (AVE) constitui uma grave patologia do sistema circulatório, segundo dados da OMS, ele é responsável por cerca de 12,3% das mortes pelo mundo², no Brasil e na América Latina o AVE configura uma das principais causas de morte e invalidez.³

O AVE é definido como um distúrbio do fluxo sanguíneo para regiões do encéfalo, comprometendo o suprimento de nutrientes, levando a dano tecidual e comprometimento da resposta neurológica fisiológica.⁴ Grande parte dos fatores de risco para AVE são evitáveis, outras podem ser controlados, alguns fatores de risco são: hipertensão arterial, diabetes mellitus, tabagismo, etilismo, sedentarismo.⁵ O AVE é dividido em dois tipos de acordo com sua etiologia, isquêmico e hemorrágico, o primeiro constitui o mais prevalente, sendo responsável por mais de 80 % dos casos.³ O Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH) embora sendo menos comum é possui índices maiores de mortalidade e morbimortalidade ao redor do mundo.⁶

A MRS mede a capacidade neurológica, o senso de lucidez e a independência do indivíduo após um AVE. Essa escala varia de 0 a 6, em que 6 indica o óbito e 0 a ausência de sintomas. A escala de referência usada como base para formular a MRS possui pontuação de 0 ou 1, em que a pontuação 1 é atribuída aos pacientes com pontuação 4 ou mais na escala expandida, e os de pontuação 0 para as pontuações inferiores a 4.⁷

Durante o AVC vários agentes pró inflamatórios são recrutados da circulação periféricas, afim de promover uma neuroinflamação imediata no local, alguns desses são as quimiocinas, radicais livres, e diversas citocinas, como as interleucinas.⁸ A interleucina 1 é parte integrante desse processo. A familiar da interleucina 1 é dividida em dois tipos, interleucina 1A e interleucina 1B. Elas agem como pirógenos endógenos no sitio hipotalâmico, no endotélio são responsáveis por induzir moléculas de adesão a efeitos pró trombóticos.⁹⁻¹⁰ A interleucina 1B é codificada pelo gene IL1B que localiza-se no cromossomo 2q14.1 e possui 7 éxons.¹¹

O presente estudo buscou analisar a associação entre do polimorfismo IL1B - 511 (C/T), rs16944 e o AVEH em uma amostra brasileira. Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal, número do parecer: 0095/2010.

Método

Trata-se de um estudo do tipo clínico, transversal, descritivo, onde os participantes do grupo caso foram oriundos da população domiciliada no Distrito Federal (Brasil), sendo selecionados por meio do registro em um hospital que atende a população do DF, entorno e estados vizinhos para procedimentos de elevada complexidade. Participaram deste estudo 81

pacientes, portadores do AVEH, dos quais: 48 mulheres e 33 homens; e idade média de $53,5 \pm 5,9$ anos.

Para a análise de genotipagem, as amostras de cada paciente foram obtidas por punção venosa para extração do DNA, 10 mL. O DNA foi extraído do sangue periférico com o kit Invisorb Spin Blood Mini Kit (250) para a extração do DNA da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A integridade do DNA foi observada em corrida eletroforética através de gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, e a concentração média foi estimada no aparelho NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fischer Scientific) no qual a concentração média alcançada foi de 20 ng/ μ L.

O DNA diluído foi submetido à técnica de PCR (Polymorphism Polymerase Chain Reaction). As sequências de oligonucleotídeos, utilizadas para avaliar o polimorfismo, foram: F 5'-TGG-CAT-TGA-TCT-GGT-TCA-TC-3' e R 5'-GTT-TAG-GAA-TCT-TCC-CAC-TT-3'. As condições de termociclagem foram 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos oligonucleotídeos a 55 °C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos e resfriamento por 4 minutos. O equipamento utilizado foi o Termociclador Techne modelo TC-512.

Em cada reação foram utilizados 4,0 μ L de DNA genômico na concentração final de 2,5 ng/ μ L; 2,5 μ L de tampão 10x (10mM de Tris e 50 mM de KCl); 0,5 μ L de MgCl₂ 50mM (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), 0,5 μ L de desoxirribonucleotídeo trifostato (dNTPs; 2,5 mM; Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil); 0,5 μ L de Taq-Polimerase, (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), 5 U/ μ L); 1,5 μ L de cada oligonucleotídeo forward e reverse (10 μ M, IDT technologies); completando com água Milli-Q para um volume final de 25 μ L por reação.

Os produtos da PCR em questão foi fragmentos de 304pb, posteriormente digerido com a enzima de restrição Aval (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA). O alelo 1 (C) cria novo sítio de restrição, e o fragmento de 304pb é clivado em dois de 190pb e 114pb; o alelo 2 (T) não é clivado pela enzima, e assim, o polimorfismo foi dividido em genótipo de clivagem, ou ancestral homocigoto(CC), heterocigoto (CT) e genótipo de não clivagem, ou homocigoto recessivo (TT). Para montagem do sistema de digestão foram utilizados: 10,0 μ L da PCR; 2,0 μ L de tampão 10x NEB4 (Biolabs); 1 μ L de enzima AvaI (10 U/ μ L), completando com água Milli-Q para um volume final de 20 μ L por reação. O sistema foi mantido a 37°C por 3 horas. Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídeo 0,1% em uma potência de 100W por 20 minutos.

Resultados

As características clínicas dos pacientes foram comparadas no estudo da associação estatística entre o polimorfismo da Tabela 1, adotando o valor crítico de 0,050. O sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, tabagismo e etilismo não mostram associação estatística com a distribuição genotípica do polimorfismo. O polimorfismo rs16944 não mostrou associação estatística com o aparecimento do AVEH nos pacientes.

Tabela 1 - Associação entre o polimorfismo genético da IL1B -511 (C/T) rs16944 e aspectos clínicos.

		IL 1B-511				P
		CC		CT+TT		
		N	%	N	%	
Gênero	Feminino	20	57,1%	28	60,9%	0,740
	Masculino	15	42,9%	18	39,1%	
HAS ¹	Sim	26	74,3%	34	73,9%	0,999
	Não	9	25,7%	12	26,1%	
Diabetes	Sim	1	2,9%	2	4,3%	0,999
	Não	34	97,1%	44	95,7%	
Tabagismo	Sim	15	42,9%	17	37,0%	0,590
	Não	20	57,1%	29	63,0%	
Alcolismo	Sim	10	28,6%	12	26,1%	0,806
	Não	25	71,4%	34	73,9%	
ERS ²	Mau prognóstico	2	5,7%	8	17,4%	0,174
	Bom prognóstico	33	94,3%	38	82,6%	

¹Hipertensão Arterial Sistêmica; ²Escala de Rankin Modificada; Teste Qui-quadrado.

Discussão

Dados apontam para a relação da IL-1 β com a ativação transcricional do gene NF-kB que estaria relacionado com a síntese de moléculas de adesão no endotélio, contribuindo para o conglomerado de células inflamatórias no endotélio. Também, a IL-1 β eleva a atividade dos macrófagos, presente em processos inflamatórios de doenças, como exemplo a Arteriosclerose.¹²

O prognóstico não mostrou relação estatística entre o polimorfismo IL1B (-511 C/T) e o perfil de comprometimento neurológico, de acordo com a Escala de Rankin Modificada dos casos avaliados.

Outro aspecto avaliado foram os fatores de risco, termo que também pode ser utilizado para definir as características clínicas ou hábitos de vida que poderiam aumentar a probabilidade de desenvolvimento de doenças.¹³ Selecionamos para o estudo a HAS, diabetes, tabagismo e etilismo.

A HAS é o principal fator de risco modificável para o desenvolvimento do AVE, aumentando o risco de três a quatro vezes e sendo diretamente responsável por pelo menos metade dos casos.⁵ É sugerido que o Diabetes Mellitus (DM) possua relação com a aceleração do processo de aterosclerose, sendo, por este motivo, reconhecidamente um fator de risco para o AVE, com maior ocorrência nos episódios isquêmicos, quando comparados aos episódios hemorrágicos.¹⁴ A citocina próinflamatória IL-1 β possui a habilidade de impactar negativamente o transpote de glicose induzido pela insulina.¹⁵⁻¹⁶

Embora sejam reconhecidamente importantes no desfecho AVEH/Aneurisma, não houve associação entre o polimorfismo IL1B -511/T e as características clínicas/hábitos: HAS, diabetes, tabagismo e etilismo (P>0,05).

O Acidente Vascular Encefálico, segundo dados da OMS, é a segunda causa de morte no mundo, acometendo principalmente pessoas idosas e de meia idade. No Brasil, apresenta-se como a primeira causa de morte e

incapacidade, sendo responsável por elevada a mortalidade e sequelas que acompanharão o paciente pelo resto de sua vida.¹⁷ A compreensão dos mecanismos moleculares e a influência dos fatores de risco, ampliam a percepção médica para identificar pessoas com elevado risco de sofrerem complicações clínicas pelo AVE, em especial o AVEH.

Conclusão

O estudo demonstrou que a variação de C e T no polimorfismo do gene rs16944 não está associada com os aspectos clínicos selecionados. Também mostrou não haver associação estatística com a manifestação da doença e a variação genotípica. Porém, o estudo ficou limitado a uma quantidade pequena de pacientes, seria necessária uma quantidade maior para ter certeza, pois o valor estatístico na correlação com o surgimento da doença ficou próximo do limite estabelecido.

Referências

1. Malta DC, Silva Jr JB da. O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2013 Mar;22(1):151-64. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742013000100016&lng=en&nrm=iso&tlng=en
2. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014 - Global Target 7: Halt the rise in diabetes and obesity [Internet]. 2014. Available from: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>
3. Porcello Marrone LC, Diogo LP, de Oliveira FM, Trentin S, Scalco RS, de Almeida AG, et al. Risk Factors among Stroke Subtypes in Brazil. *J Stroke Cerebrovasc Dis* [Internet]. 2013 Jan;22(1):32-5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1052305711001509>
4. Hao Y, Ding J, Hong R, Bai S, Wang Z, Mo C, et al. Increased interleukin-18 level contributes to the development and severity of ischemic stroke. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2019 Sep 16;11(18). Available from: [http://www.aging-us.com/article/102253/text?_escaped_fragment_="](http://www.aging-us.com/article/102253/text?_escaped_fragment_=)
5. RIBEIRO K, NEVES R, BRITO G, MORAIS J, LUCENA E, MEDEIROS J, et al. Perfil de Usuários Acometidos por Acidente Vascular Cerebral Adscritos à Estratégia Saúde da Família em uma Capital do Nordeste do Brasil. *Rev Bras Ciências da Saúde* [Internet]. 2012 Jul 30;16(2):35-44. Available from: <http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/rbcs/article/view/16433/9522>
6. Wu X, Luo X, Zhu Q, Zhang J, Liu Y, Luo H, et al. The Roles of Thrombospondins in Hemorrhagic Stroke. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017;2017:1-8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/8403184/>
7. Falcão CH, Falcão ALE, Ulhoa A, Rezende MT, Salgado CG, Malheiros WG, et al. Trombólise intra-arterial associada a angioplastia adjunta na fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico. *Rev Bras Cardiol Invasiva* [Internet]. 2010;18(3):263-72. Available from:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-83972010000300007&lng=pt&nrm=iso&tlng=en

8. Ye L, Gao L, Cheng H. Inflammatory Profiles of the Interleukin Family and Network in Cerebral Hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2018 Oct 19;38(7):1321–33. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10571-018-0601-x>
9. Gorący, Kaczmarczyk, Ciechanowicz, Lewandowska, Jakubiszyn, Bodnar, et al. Polymorphism of Interleukin 1B May Modulate the Risk of Ischemic Stroke in Polish Patients. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 2019 Sep 2;55(9):558. Available from: <https://www.mdpi.com/1010-660X/55/9/558>
10. Luotola K, Pääkkönen R, Alanne M, Lanki T, Moilanen L, Surakka I, et al. Association of Variation in the Interleukin-1 Gene Family with Diabetes and Glucose Homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2009 Nov;94(11):4575–83. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2009-0666>
11. Bensi G, Raugei G, Palla E, Carinci V, Buonamassa DT, Melli M. Human interleukin-1 beta gene. *Gene* [Internet]. 1987 Jan;52(1):95–101. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378111987903982>
12. Francisco G, Hernández C, Simó R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2006 Jul;369(1):1–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898106000039>
13. Ahangar AA, Saadat P, Heidari B, Taheri ST, Alijanpour S. Sex difference in types and distribution of risk factors in ischemic and hemorrhagic stroke. *Int J Stroke* [Internet]. 2018 Jan 31;13(1):83–6. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1747493017724626>
14. Chen R, Ovbiagele B, Feng W. Diabetes and Stroke: Epidemiology, Pathophysiology, Pharmaceuticals and Outcomes. *Am J Med Sci* [Internet]. 2016 Apr;351(4):380–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002962915379337>
15. Timper K, Dalmas E, Dror E, Rütli S, Thienel C, Sauter NS, et al. Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide Stimulates Glucagon-Like Peptide 1 Production by Pancreatic Islets via Interleukin 6, Produced by α Cells. *Gastroenterology* [Internet]. 2016 Jul;151(1):165–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508516003048>
16. Qi XF, Feng TJ, Yang P, Feng HY, Zhang P, Kong LY, et al. Role of inflammatory parameters in the susceptibility of cerebral thrombosis. *Genet Mol Res* [Internet]. 2014;13(3):6350–5. Available from: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2014/vol13-3/pdf/gmr3612.pdf>
17. Community O, Project S. Características clínico-demográficas dos acidentes vasculares encefálicos de pacientes atendidos no Hospital Público Regional de Betim, MG. 2011;21(4):384–9.

Autor de Correspondência

Izabel Cristina Rodrigues da Silva.
Campus Universitário, s/n, Centro Metropolitano.
CEP: 72220-275. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
belbiomedica@gmail.com