



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Ausência de associação entre os polimorfismos do gene interleucina-18 e artrite reumatoide

Ticiania Della Justina Farias^{a,&}, Luisa Matos do Canto^{a,&}, Mayara Delagnelo Medeiros^a, Aline Fernanda Rodrigues Sereia^a, Lia Kubelka Fernandes de Carlos Back^a, Filipe Martins de Mello^b, Adriana Fontes Zimmermann^c, Ivânio Alves Pereira^c, Yara Costa Netto Muniz^a, Andrea Rita Marrero^a, Ilíada Rainha de Souza^{a,*}

^aLaboratório de Polimorfismos Genéticos, Universidade Federal de Santa Catarina LAPOGE/ (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil

^bHospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade do Estado de São Paulo (HC-FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

^cServiço de Reumatologia, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), Florianópolis, SC, Brasil

INFORMAÇÕES

Histórico do artigo:

Recebido em 2 de fevereiro de 2012

Aceito em 13 de dezembro de 2012

Palavras-chave:

Interleucina-18

Artrite reumatoide

Doenças cardiovasculares

Polimorfismo genético

Brasil

RESUMO

Objetivo: Analisar a associação dos polimorfismos do gene interleucina-18 (IL-18) com artrite reumatoide (AR) e com fatores de risco de doenças cardiovasculares (DCV).

Métodos: A amostra foi constituída por 97 pacientes com AR e 151 controles saudáveis. Nos primeiros, foram analisados fatores de risco de DCV, tais como níveis do colesterol, hipertensão arterial, tabagismo e fator reumatoide, bem como o nível da proteína C-reativa (CRP). O DNA foi extraído e foram analisados os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nas posições -607C/A e -137G/C do gene IL-18 em ambos os grupos. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o odds ratio (OR) foram realizados, considerando IC 95% e $P < 0,05$.

Resultados: As frequências do alelo -607A nos pacientes com AR e nos controles foram de 0,443 e 0,424 e do alelo -137C foram de 0,304 e 0,291, respectivamente. As frequências do genótipo estavam em EHW, exceto em controles no locus -137 ($P = 0,006$). Não foi encontrada associação dos polimorfismos do gene IL-18 com AR, nem com fatores de risco de DCV, incluindo o nível do colesterol e de CRP ($P > 0,05$). Além disso, observaram-se mais indivíduos fumantes entre pacientes com AR em comparação aos controles (OR = 1,691; $P = 0,088$), e os níveis de CRP eram ligeiramente mais elevados em pacientes fumantes quando comparados aos de pacientes não fumantes (OR = 2,673; $P = 0,061$).

Conclusões: Ao analisar uma amostra de pacientes com AR no sul do Brasil, não foi encontrada associação dos polimorfismos do gene IL-18 com AR, nem com os fatores de risco de DCV.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

[&] Os autores contribuíram igualmente neste manuscrito.

* Autor para correspondência.

E-mail: iliadarainha@gmail.com (I.R. de Souza)

Lack of association between interleukin-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis

ABSTRACT

Keywords:

Interleukin-18
Rheumatoid arthritis
Cardiovascular diseases
Gene polymorphism
Brazil

Objective: To assess the association of the polymorphisms of the interleukin-18 (IL-18) gene with rheumatoid arthritis (RA) and with risk factors for cardiovascular diseases (CVD).

Methods: This sample comprised 97 patients with RA and 151 healthy controls. In the patients, risk factors for CVD were analyzed, such as cholesterol levels, arterial hypertension, smoking habit, C-reactive protein (CRP) level, and rheumatoid factor. DNA was extracted and the single nucleotide polymorphisms (SNP) at the -607C/A and -137G/C positions of the IL-18 gene were assessed in both groups. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated and the odds ratio (OR) test performed, considering a 95% CI and $P < 0.05$.

Results: The frequencies of the -607A allele in patients with RA and in controls were 0,443 and 0.424, respectively, and of the -137C allele, 0.304 and 0.291, respectively. The genotype frequencies were in HWE, except for controls in the -137 locus ($P = 0.006$). Association of the polymorphisms of the IL-18 gene was found with neither RA nor risk factors for CVD, including cholesterol level and CRP ($P > 0.05$). In addition, more smokers were found among patients with RA as compared with controls (OR = 1.691; $P = 0.088$), and the CRP levels were slightly higher in patients who smoked than in patients who did not (OR = 2.673; $P = 0.061$).

Conclusions: In this sample of patients with RA in the South of Brazil, association of the polymorphisms of the IL-18 gene was observed with neither RA nor risk factors for CVD.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica autoimune caracterizada por inflamação crônica, que leva a destruição articular e complicações sistêmicas, aumentando a morbimortalidade.^{1,2} Essa doença afeta 0,5%–1% da população geral mundial, sendo a incidência maior em mulheres do que em homens.³ Embora a incidência e as manifestações clínicas da AR variem em diferentes regiões geográficas, na América Latina, e em especial no Brasil, essas informações são escassas.^{4,5} Portanto, é importante esclarecer a patogênese da AR em uma população heterogênea como a do Brasil.

A AR tem etiologia complexa e pouco clara, mas, em indivíduos geneticamente suscetíveis, fatores ambientais específicos podem ativar reações imunes patogênicas, tais como a formação de autoanticorpo e resposta autorreativa.^{1-3,6} O início da AR pode ser indicado pelo desenvolvimento de anticorpos antipeptídeo citrulinado cíclico (ACPA) e fator reumatoide (FR) relacionados à perda de autotolerância.⁷ Recentemente, dois subgrupos de AR foram identificados com base na presença ou ausência de ACPA. Pacientes com ACPA apresentam mais manifestações extra-articulares, tabagismo, e pior prognóstico.² A principal causa de mortalidade de pacientes com AR são as doenças cardiovasculares (DCV). Como o risco de DCV em pacientes com AR é 50% maior do que o da população geral, acredita-se que outros fatores de risco estejam presentes na AR.^{8,9} A patogênese de dano cardiovascular acelerado é causada por fatores de risco cardiovascular tradicionais em combinação com mecanismos inflamatórios e autoimunes relacionados à doença.^{10,11}

A inflamação desempenha um papel importante na lesão aterosclerótica e os pacientes com AR têm maior prevalência de aterosclerose.¹² Nas doenças imunomediadas, tais como a AR, a lesão vascular aterosclerótica acelerada e precoce pode

ser parcialmente explicada por resposta autoimune humoral e celular contra antígenos expressos no endotélio.^{8,13}

Citocinas também estão envolvidas em muitos processos imunes associados à patogênese da AR, especialmente na manutenção de uma ativa resposta inflamatória. Como as citocinas estão envolvidas em eventos imunorreguladores e de destruição tecidual, parece plausível que elas influenciem na gravidade das manifestações da AR.⁷ A interleucina-18 (IL-18), uma citocina pró-inflamatória produzida na AR por várias células sinoviais, tais como macrófagos, condrócitos e osteoblastos, induz vias de sinalização comuns a outros membros da família IL-1, tais como a ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e a expressão do interferon- γ .^{7,14-16}

A administração de IL-18 em camundongos leva ao desenvolvimento de artrite inflamatória erosiva, sugerindo sua participação no processo pró-inflamatório *in vivo*.¹⁴ Além disso, a expressão de mRNA e a concentração da proteína IL-18 detectados em tecidos sinoviais se mostram mais elevados em AR que em controles osteoartríticos.¹⁴ Estrutura, concentração e regulação de IL-18 podem variar devido a diferenças genéticas que afetam a expressão do gene da IL-18.¹⁶

A condição inflamatória crônica vista na AR eleva os níveis e a expressão de proteína C-reativa (CRP), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), e interleucinas-1, -6, e -18, que são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de DCV.^{11,13,19} A IL-18 é considerada pró-aterogênica, possivelmente atuando como mediador de inflamação vascular, levando ao aumento e à vulnerabilidade da placa aterosclerótica e, finalmente, à sua ruptura.¹⁸ Os adipócitos humanos também podem produzir IL-18, contribuindo para as concentrações sistêmicas de IL-18 e o maior risco de diabetes e DCV, que estão associados com obesidade e estados de resistência à insulina.¹⁹

A concentração plasmática de IL-18 mostrou-se elevada em pacientes após infarto miocárdico, tendo sido associada com aterosclerose coronária.²⁰ Variações no gene IL-18 foram asso-

ciadas com o aumento das concentrações séricas de IL-18 e maior mortalidade cardiovascular em pacientes com doença arterial coronária.²¹ Outros estudos mostraram que polimorfismos do gene IL-18 estão envolvidos no desenvolvimento de acidente vascular encefálico isquêmico,²² infarto miocárdico (IM),²³ e maior risco de mortalidade cardiovascular.²⁴ Além disso, altos níveis séricos de IL-18 foram associados com fatores de risco tradicionais, tais como níveis anormais de LDL- e HDL-colesterol, obesidade, resistência à insulina e disfunção celular.²⁰

Embora a produção endógena de IL-18 seja afetada por múltiplos fatores, diferenças individuais também poderiam ser determinadas por polimorfismos genéticos, podendo afetar os níveis de expressão das citocinas envolvidas na resposta celular do tipo Th1 e Th2. Esse mecanismo poderia ser responsável por uma elevada resistência a infecções microbianas, mas também por uma maior suscetibilidade a distúrbios autoimunes em indivíduos portadores de alelos IL-18 mais ativos.¹⁵

A transcrição do gene IL-18 pode ser afetada pela presença de polimorfismos em sua região promotora, cujas variantes poderiam levar a diferenças na ligação ao fator de transcrição. Dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) na região promotora nas posições -607C/A e -137G/C foram estudados, e tais alterações rompem um potencial sítio de ligação da proteína ligadora ao elemento de resposta ao AMPc e do fator nuclear H4TF-1, respectivamente.^{15,25}

Em pacientes com AR, o aumento das frequências do alelo -607A e/ou do alelo -137C estão relacionadas à deficiência na transcrição do gene; isso seria benéfico para o indivíduo, protegendo contra o desenvolvimento de AR. Um estudo demonstrou que o genótipo -607AA está associado com menor prevalência de AR em uma população chinesa.²⁵

Por outro lado, homozigose para C na posição -607 e para G na posição -137 promove níveis mais elevados do RNAm de IL-18 em comparação aos outros genótipos, e tais níveis elevados de IL-18 pró-inflamatória medeiam muitos processos inflamatórios agudos e crônicos.^{15,25}

Este estudo teve por objetivo analisar a influência dos polimorfismos de IL-18 presentes nos pacientes com AR, assim como nos fatores de risco para DCV (dislipidemia, pressão arterial e tabagismo).

Métodos

Este estudo avaliou 97 pacientes diagnosticados com AR de acordo com a classificação do American College of Rheumatology de 1987. Tais pacientes originaram-se do ambulatório da Divisão de Reumatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. Um grupo controle foi formado com 151 voluntários saudáveis sem história pessoal ou familiar de doença autoimune. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (CEP/UFSC - 172/06). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre informado. Dados familiares e epidemiológicos foram coletados através de questionários estruturados. Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos.

Os seguintes fatores de risco para DCV tradicionais foram considerados: elevados níveis de colesterol total (> 200 mg/dL) e LDL-colesterol (> 100 mg/dL); hipertensão arterial sistêmica

(pressão arterial sistólica \geq 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica \geq 90 mmHg); hábito tabagista; positividade para FR (> 20 IU/mL); e níveis de CRP acima do valor de referência (> 5mg/L).

Amostras de sangue periférico foram coletadas para extração de DNA.²⁶ O SNP -607C/A (rs1946518) do gene IL-18 foi detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) que detecta o polimorfismo de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados pela ação de enzimas de restrição (PCR-RFLP), amplificando um segmento com 301 pares de bases (pb) cobrindo o sítio polimórfico, usando as sequências de *primers* da Tabela 1.²⁷ Para detectar o polimorfismo, os produtos da PCR foram submetidos a digestão pela enzima de restrição MseI (BioLabs Inc., New England), a 37°C por 12 horas, e então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% e corados com brometo de etídio a 1%. Os produtos da PCR digeridos foram identificados como indivíduos homozigotos CC quando cortados em fragmentos com 199 e 73 pb, e como indivíduos homozigotos AA quando cortados em fragmentos com 101, 98 e 73 pb. Os indivíduos heterozigotos CA foram identificados ao apresentar os fragmentos com 199, 101, 98 e 73 pb (fig. 1a).

O SNP -137G/C (rs187238) do mesmo gene foi detectado pelo método de reação em cadeia da polimerase com *primers* de sequência específica (PCR-SSP), de acordo com Takada et al. (2002).²⁷ Esse método utiliza um *primer* reverso comum (R) e dois *primers forward* de sequência específica, F1 específico para o alelo C e F2 específico para o alelo G, amplificando um produto de 261 pb (Tabela 1). Como controle interno positivo de amplificação, utilizou-se um *primer forward* controle (F) para amplificar um fragmento de 446 pb, que cobre o sítio de polimorfismo (Tabela 1) (fig. 1b). Para confirmação da tipagem, controles negativos e positivos foram usados para cada genótipo em todos os experimentos nos dois métodos de detecção de SNP.

A averiguação das frequências dos alelos e genótipos nos pacientes com AR e controles dos dois SNPs -607 e -137 foi realizada por contagem direta. Para verificar a distribuição genotípica, o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi calculado com o programa GENEPOP.²⁸ Como os dois SNPs estão localizados no mesmo gene, verificou-se se foram herdados juntos devido a desequilíbrio de ligação utilizando o programa GENEPOP. Uma vez que os dois SNPs estão ligados, podem ser considerados um haplótipo, sendo a frequência da combinação haplotípica foi calculada com o programa PHASE.²⁹

Tabela 1 – Sequências de *primers* usadas para amplificar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) -607 e -137 na região promotora do gene da interleucina (IL)-18 pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Posição	Sequências de <i>primers</i>
-607	F: 5-CTTTGCTATCATTCCAGGAA-3 R: 5-TAACCTGATTCAGGACTTCC-3
-137	controle F: 5-CCAATAGGACTGATTATTCCGCA-3 controle R: 5-AGGAGGGGAAAATGCACTGG-3
Alelo C	F1 específico: 5-CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAG-3
Alelo G	F2 específico: 5-CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAC-3
F, <i>primer forward</i> ; R, <i>primer</i> reverso. G e C são alelos.	

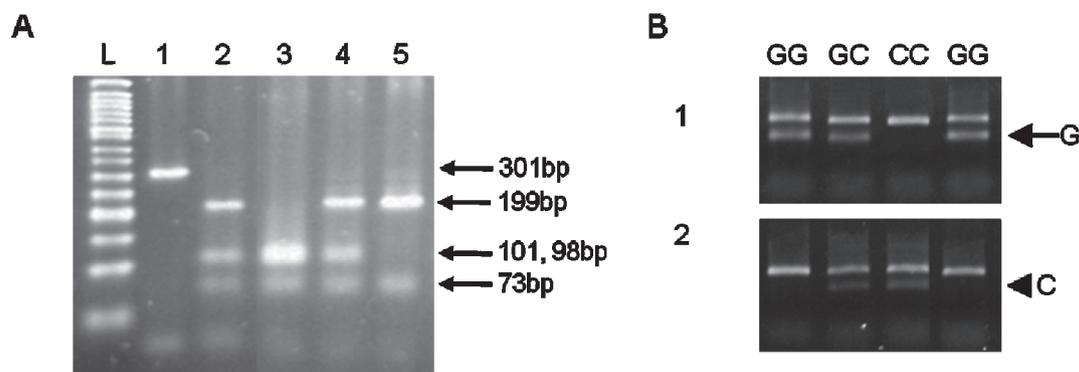


Figura 1 – Genotipagem para os polimorfismos de IL-18 nas posições -607 (a) e -137 (b). (a) Genotipagem para SNP -607 C/A locus no gene IL-18 pela técnica PCR-RFLP, cujos produtos PCR sofreram digestão MseI (Biolabs, New England) a 37°C por 12 horas, sendo então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% e corados com brometo de etídio a 1%.²⁷ (b) Genotipagem para SNP -137 G/C locus no gene IL-18 pela técnica PCR-SSP, cujos produtos PCR são alelo-específicos, submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídio a 1%.²⁷ Na figura, cada linha representa um indivíduo. Em (1), os produtos PCR foram amplificados com primer específico para o alelo G (seta). Em (2), os produtos PCR foram amplificados com primer específico para o alelo C (ponta da seta). O fragmento que foi amplificado pelos primers específicos tinha 261 pb, enquanto o controle interno estava presente nos dois ensaios e amplificou um fragmento com 446 pb. Portanto, se as duas bandas estão presentes no gel, o alelo específico está presente (ex. linha 2 representa o genótipo GC).

L, 50bp ladder; 1, produto PCR (301 pb) sem digestão; amostras 2 e 4 foram genotipadas como CA (199, 101, 98 e 73 pb); amostra 3 foi genotipada como AA (101, 98 e 73 pb) e amostra 5 foi genotipada como CC (199pb e 73pb).

A razão de chance (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95% foi obtida por análise de associação³⁰ dos polimorfismos (alelos, genótipos e haplótipos). A análise foi realizada separadamente para dados clínicos e epidemiológicos, assim como para suscetibilidade a AR, sendo posteriormente confirmada utilizando o programa HDS EpiMax Calculator.³¹ Os alelos -607A e -137G foram considerados como alelos de risco para suscetibilidade a AR. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

O gênero feminino correspondeu a 88,66% dos pacientes com AR e a 96,40% dos controles ($P > 0,05$). A idade média dos pacientes com AR foi de $54,63 \pm 12,48$ anos e a dos controles, $48,00 \pm 15,56$ anos ($P > 0,05$). Embora a etnia euro-brasileira tenha predominado nos pacientes com AR e nos controles, a frequência de afro-brasileiros e ameríndio-brasileiros foi maior entre os pacientes com AR do que entre os controles ($P = 0,027$) (Tabela 2).

As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos do gene IL-18 foram estimadas nos pacientes e nos controles. As frequências alélicas são mostradas na Tabela 3. A distribuição das frequências genotípicas dos dois SNPs estavam de acordo com o EHW nos pacientes com AR e controles, exceto as frequências genotípicas de -137 SNP nos controles ($P = 0,006$) (Tabela 4). Além disso, os polimorfismos -607 e -137 apresentavam desequilíbrio de ligação nos pacientes com AR e nos controles ($P < 0,001$), os dois SNPs foram analisados como haplótipos (Tabela 5). Demonstramos que as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas do gene IL-18 foram semelhantes nos pacientes com AR e nos controles,

e que os polimorfismos do gene IL-18 não foram associados com o desenvolvimento de AR ($P > 0,05$).

A prevalência de fatores de risco para DCV nos pacientes com AR foi: hipercolesterolemia, 54,95%; hipertensão arterial, 56,99%; tabagismo, 41,76%; positividade para FR, 66,27%; e níveis elevados de CRP, 52,38% (Tabela 2). Hipercolesterolemia e hipertensão arterial não foram associados aos polimorfismos do gene IL-18. Além disso, o tabagismo nos pacientes com AR apresentou tendência de associação com positividade para FR (OR = 2,199; IC 95%: 0,739–6,677; $P = 0,182$) e níveis elevados de CRP (OR = 2,673; IC 95%: 0,961–7,546; $P = 0,061$). A frequência de fumantes foi maior entre os pacientes com AR do que entre os controles (OR = 1,691; IC 95%: 0,930–3,079; $P = 0,088$), mas não foi estatisticamente significativa. Ainda, nem FR nem tabagismo associaram-se aos polimorfismos -607 e -137.

Discussão

Este é um importante estudo, pois analisa pela primeira vez em uma população brasileira as características genéticas da citocina pró-inflamatória IL-18 e seu papel na AR. Essa citocina pode estar envolvida na condição inflamatória característica que causa tantos danos aos pacientes com AR.

As frequências genotípicas dos dois SNPs -607 e -137 encontradas no presente estudo assemelham-se às de outros estudos caso-controle incluindo pacientes caucasianos com AR, tais como o estudo polonês³² e o espanhol.³³ No entanto, diferem das frequências genotípicas relatadas em estudos asiáticos.^{25,34} A semelhança com a população europeia quanto às frequências genotípicas pode ser explicada pela alta prevalência de descendentes europeus em nossa amostra, uma

Tabela 2 – Caracterização clínica e epidemiológica de pacientes com artrite reumatoide e controles do sul do Brasil.

	Pacientes, n (%)	Total, n *	Controles, n (%)	Total, n *
Dados epidemiológicos				
Gênero feminino	86 (88,65)	97	146 (96,40)	151
Idade média	54,63 (± 12,48)	97	48,00 (± 15,56)	151
Euro-brasileiro	69 (75,82)	91	121 (88,32)	137
Afro-brasileiro	20 (21,98)	91	15 (10,94)	137
Ameríndio-brasileiro	2 (2,20)	91	1 (7,29)	137
Tabagismo	38 (41,76)	91	39 (29,77)	131
Dados clínicos				
Hipercolesterolemia	50 (54,95)	91	DF	
Hipertensão arterial	53 (56,99)	93	DF	
Positividade para FR	55 (66,27)	83	DF	
Altos níveis de CRP	44 (52,38)	84	DF	

DF, dados faltantes; CRP, proteína C-reativa.
* O valor de n variou devido à disponibilidade de dados.

Tabela 3 – Frequências alélicas dos polimorfismos na região promotora do gene IL-18 (-607C/A e -137G/C) em pacientes com artrite reumatoide e controles.

	Pacientes, n (%)	Total, n *	Controles, n (%)	Total, n *
SNP-607				
Alelo A	43 (44,3)	64 (42,4)	1,064 (0,732–1,547)	0,80
SNP-137				
Alelo C	30 (30,4)	44 (29,1)	1,063 (0,703–1,606)	0,84

OR, odds ratio (razão de chance); IC, intervalo de confiança 95%.
P < 0,05 foi considerado significativo.

Tabela 4 – Frequências genotípicas dos polimorfismos na região promotora do gene IL-18 (-607C/A e -137G/C) em pacientes com artrite reumatoide e controles.

	Pacientes n = 97 (%)	Controles n = 151 (%)	OR (95% IC)	P
-607 Genótipos				
CC	31 (32)	48 (32)	1,0 (Ref.)	—
CA	46 (47)	78 (52)	0,914 (0,497-1,681)	0,86
AA	20 (21)	25 (16)	1,164 (0,522-2,593)	0,83
(CA+AA) versus CC	—	—	0,947 (0,550-1,729)	1,00
EHW	$\chi^2 = 0,149$	—	—	0,83
	—	$\chi^2 = 0,502$	—	0,33
-137 Genótipos				
GG	45 (46)	70 (46)	1,0 (Ref.)	—
GC	45 (46)	74 (49)	0,946 (0,540-1,658)	0,94
CC	7 (8)	7 (5)	1,556 (0,452-5,365)	0,62
(GC+CC) versus GG	—	—	0,999 (0,580-1,720)	1,00
EHW	$\chi^2 = 0,599$	—	—	0,34
	—	$\chi^2 = 5,264$	—	0,006

OR, odds ratio (razão de chance); χ^2 , qui-quadrado; IC, intervalo de confiança 95%; EHW, equilíbrio de Hardy-Weinberg.

P < 0,05 foi considerado significativo.

Os genótipos -607CC e -137GG foram considerados como referência (OR = 1,0).

vez que muitos imigrantes europeus se estabeleceram no sul do Brasil.³⁵

Um estudo chinês relatou que o genótipo AA do SNP -607 confere proteção contra o desenvolvimento de AR.²⁵ No entanto, aquele estudo não mostrou associação dos dois SNPs -607 e -137 do gene IL-18 com a suscetibilidade ao desenvolvimento de AR. Da mesma maneira, uma meta-análise recente sobre doenças autoimunes³⁶ concluiu que tais polimorfismos não estavam relacionados ao desenvolvimento de AR, como

em outros estudos realizados na Polônia,³² Espanha³³ e China.³⁴ O último estudo também mostrou que o SNP -607 não altera os níveis séricos de IL-18.³⁴

Embora a AR seja doença de etiologia complexa, acredita-se ser causada pela combinação de suscetibilidade genética e vários fatores ambientais, tais como infecções e características de estilo de vida; a contribuição exata de cada um desses fatores para o desenvolvimento de AR em diferentes populações ainda não está bem entendida e requer mais pesquisas.^{3,37}

Tabela 5 – Frequências haplotípicas dos polimorfismos na região promotora do gene IL-18 (-607C/A e -137G/C) em pacientes com artrite reumatoide e controles.

	Pacientes 2n = 194(%)	Controles 2n = 302(%)	OR (IC 95%)	P
Haplótipo (-607/-137)				
C/G	103 (53)	159 (53)	1,018 (0,698–1,485)	0,99
C/C	5 (3)	15 (5)	0,512 (0,160–1,534)	0,28
A/G	32 (16)	55 (18)	0,898 (0,541–1,260)	0,75
A/C	54 (28)	73 (24)	1,228 (0,798–1,888)	0,38

OR, odds ratio (razão de chance); IC, intervalo de confiança 95%.
P < 0,05 foi considerado significativo.

Demonstramos que os SNPs do gene IL-18 estavam em desequilíbrio de ligação em pacientes com AR, como já mostrado em estudos anteriores.^{25,32,33} Não foi encontrada associação dos haplótipos com suscetibilidade à AR, como nos estudos espanhol³⁴ e chinês.²⁵ No entanto, um estudo da Polônia relatou uma redução significativa no número de indivíduos com diplótipos AC/AC e AG/AG entre pacientes com AR e controles, sugerindo que esses diplótipos estão relacionados ao desenvolvimento de AR.³² Os polimorfismos na região promotora do gene IL-18 afetam sua atividade transcricional, mas tal efeito depende de tipos celulares e do ambiente local da citocina. Assim, a interação entre genótipo e ambiente celular precisa ser avaliada.¹⁵

Embora a dislipidemia seja um fator de risco de DCV controverso em AR, estudos mostraram que níveis baixos de colesterol HDL são comuns e podem contribuir para a maior morbidade cardiovascular nesses pacientes.^{8,17,38,39} A dislipidemia foi associada com altos níveis de IL-18.²⁰ Entretanto, nosso estudo mostrou que altos níveis de colesterol total não se associaram com a presença dos SNPs do gene IL-18 analisados, como relatado em outros estudos.^{24,40}

A hipertensão arterial é comum entre pacientes com AR, mas a causa desse aumento de prevalência em comparação à de controles é desconhecida. Vários fatores influenciam a pressão arterial, tais como obesidade, inatividade física, polimorfismos genéticos específicos, e alguns medicamentos antirreumáticos.^{8,37} A hipertensão arterial foi associada com níveis séricos elevados de IL-18,²⁰ enquanto a expressão do RNAm dessa citocina em tecidos ateroscleróticos é elevada na presença do polimorfismo -137GC e da hipertensão arterial concomitantemente.⁴¹ Além disso, um estudo sobre fatores de risco metabólicos para DCV relatou que o genótipo -137GC aumenta o risco de hipertensão arterial em mulheres africanas em comparação com indivíduos -137GG.⁴¹ No nosso estudo, entretanto, hipertensão arterial não se associou com polimorfismos do gene IL-18, como demonstrado por Szeto et al.²⁴

O tabagismo é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de AR, e fumantes com AR apresentam títulos mais altos de FR e pior prognóstico em termos de incapacidade, dano radiográfico e resposta ao tratamento.³⁸ Não encontramos associação entre tabagismo e os polimorfismos do gene IL-18, nem entre tabagismo e FR em pacientes com AR (OR = 2,2; P > 0,05), o que difere dos dados de uma meta-análise realizada recentemente.³⁸ Da mesma forma, a presença de FR não foi associada com polimorfismos do gene IL-18, como mostrado em outros estudos sobre AR.^{15,33} Altos níveis de CRP foram mais frequentes em pacientes com AR que fumavam, mas tal associação não foi estatisticamente

significante (OR = 2,67; P = 0,061). Os níveis de CRP não se associaram com polimorfismos do gene IL-18, bem como os resultados de outros estudos.²⁴

Embora alguns estudos tenham demonstrado que a expressão do gene IL-18 seja maior em pacientes com AR e que tal citocina deva ser relevante na patogênese da doença, foi observado que os polimorfismos -607 e -137 do gene IL-18 não desempenham um papel principal na suscetibilidade à AR na nossa população. Além disso, tais polimorfismos não foram associados com fatores de risco para DCV nos nossos pacientes com AR.

A citocina IL-18 apresenta atividades pleiotrópicas na AR, com uma complexa rede de citocinas do sistema imune. Estudos futuros que considerem novos marcadores que interagem com IL-18 ou com outros genes que participam da rede de citocinas deveriam ser realizados para avaliar sua relevância na patogênese da AR e em outras doenças inflamatórias.

Suporte financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

Conflitos de interesse

Os autores declaram inexistência de conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC). Os autores agradecem aos pacientes e voluntários pela cooperação, e aos colegas, pela colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Firestein GS. Involving concepts or rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423:356-61.
2. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2009;373(9664):659-72.

3. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2005;4(3):130-6.
4. Harney S, Wordsworth BP. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 2002;60(6):465-73.
5. Coenen MJ, Grefers PK. Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape. *Genes Immun*. 2009;10(2):101-11.
6. de Souza AW, Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Cruvinel W de M, Andrade LE, et al. Immune system: part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(6):665-79.
7. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):429-42.
8. Gabriel SE, Crowson CS. Risk factors for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(2):171-6.
9. Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum*. 2008;59(12):1690-7.
10. Boyer JF, Gourraud PA, Cantagrel A, Davignon JL, Constantin A. Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Jt, Bone Spine*. 2011;78(2):179-83.
11. Bartoloni E, Alunno A, Bistoni O, Gerli R. Cardiovascular Risk in Rheumatoid Arthritis and Systemic Autoimmune Rheumatic Disorders: a Suggested Model of Preventive Strategy. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(1):14-22.
12. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Testa A, Revuelta J, Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Gay MA. Increased prevalence of severe subclinical atherosclerotic findings in long-term treated rheumatoid arthritis patients without clinically evident atherosclerotic disease. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(6):407-13.
13. Pereira IA, Borba EF. The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Swiss Med Wkly*. 2008;138(37-38):534-9.
14. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1999;104(10):1393-401.
15. Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol*. 2001;112(1-2):146-52.
16. Thompson SR, Humphries SE. Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility. *Genes Immun*. 2007; 8(2):91-9.
17. Nurmohamed MT. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2009;8(8):663-7.
18. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, et al. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation*. 2002;106:24-30.
19. Skurk T, Kolb H, Müller-Scholze S, Röhrig K, Hauner H, Herder C. The proatherogenic cytokine interleukin-18 is secreted by human adipocytes. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:863-8.
20. Hulthe J, McPheat W, Samnegård A, Tornvall P, Hamsten A, Eriksson P. Plasma interleukin (IL)-18 concentrations are elevated in patients with previous myocardial infarction and related to severity of coronary atherosclerosis independently of C-reactive protein and IL-6. *Atherosclerosis*. 2006;188(2):450-4.
21. Hernesniemi JA, Karhunen PJ, Oksala N, Kähönen M, Levula M, Rontu R, et al. Interleukin 18 gene promoter polymorphism: a link between hypertension and pre-hospital sudden cardiac death: the Helsinki Sudden Death Study. *Eur Heart J*. 2009;30(23):2939-46.
22. Zhang N, Yu JT, Yu NN, Lu RC, Ma T, Wang ND, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms and risk of ischemic stroke. *Brain Res Bull*. 2010;81(6):590-4.
23. Bis JC, Heckbert SR, Smith NL, Reiner AP, Rice K, Lumley T, et al. Variation in inflammation-related genes and risk of incident nonfatal myocardial infarction or ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2008;198(1):166-73.
24. Szeto CC, Chow KM, Poon PY, Kwan BC, Li PK. Association of interleukin-18 promoter polymorphism and atherosclerotic diseases in Chinese patients with diabetic nephropathy. *Nephrology*. 2009;14(6):606-12.
25. Sivalingam SP, Yoon KH, Koh DR, Fong KY. Single-nucleotide polymorphisms of the interleukin-18 gene promoter region in rheumatoid arthritis patients: protective effect of AA genotype. *Tissue Antigens*. 2003;62(2):498-504.
26. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2001.
27. Takada T, Suzuki E, Morohashi K, Gejyo F. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese population. *Tissue Antigens*. 2002;60(1):36-42.
28. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 1995; 86(3):248-9. Available from: <http://genepop.curtin.edu.au/> [Access in May 2011].
29. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):978-89.
30. Woolf B. On estimating the relation between blood groups and disease. *Ann Hum Genet* 1955;19(4):251-3.
31. HDS EpiMax Table Calculator. Available from: <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm> [Access in May 2011].
32. Pawlik A, Kurzawski M, Czerny B, Gawronska-Szklarz B, Drozdziak M, Herczynska M. Interleukin-18 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 2006;67(5):415-8.
33. Rueda B, González-Gay MA, Mataran L, López-Nevot MA, Martín J. Interleukin-18-promoter polymorphisms are not relevant in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 2005;65(6):544-8.
34. Ying B, Shi Y, Pan X, Song X, Huang Z, Niu Q, et al. Association of polymorphisms in the human IL-10 and IL-18 genes with rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep*. 2011;38(1):379-58.
35. Salzano FM, Freire-Maia SM. *Problems in Human Biology. A Study of Brazilian Populations*. Detroit: Wayne State University Press; 1970.
36. Pan HF, Leng RX, Ye DQ. Lack of association of interleukin-18 gene promoter -607 A/C polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Lupus*. 2011;20(9):945-51.
37. Mota LM, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol*. 2012;52(2):152-74.
38. Boyer JF, Gourraud PA, Cantagrel A, Davignon JL, Constantin A. Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Jt, Bone Spine*. 2011;78(2):179-83.
39. Torigoe, DY, Laurindo, IMM. Artrite Reumatoide e Doenças Cardiovasculares. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(1):60-6.
40. Evans J, Collins M, Jennings C, van der Merwe L, Söderström I, Olsson T, et al. The association of interleukin-18 genotype and serum levels with metabolic risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(5):633-40.
41. Hernesniemi JA, Anttila K, Nieminen T, Kähönen M, Mononen N, Nikus K, et al. IL-18 gene polymorphism, cardiovascular mortality and coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(11):994-1001.