VII EAITI 2017
ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
09 e 10 de novembro de 2017

APERFEIÇOAMENTO E IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIA MOLECULAR BASEADA EM PCR-RFLP PARA GENOTIPAGEM DAS VARIANTES GENÔMICAS DA INTERLEUCINA 16

Mônica Caldeira Emerick Souza (PIBITI/Cnpq/UEM), Leticia Fernanda Bossa (PIBITI/Cnpq/UEM) Cristiane Maria Colli (Docente-UEM), Victor Hugo de Souza (Aluno de pós-graduação PBF-UEM), Ana Maria Sell (Orientador), anamsell@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Básicas de Saúde.

Imunologia e Imunogenética.

Palavras Chave: *Interleucina 16, PCR-RFLP, polimorfismo genético.*

Resumo

A interleucina-16 (IL-16) é uma citocina pró-inflamatória e polimorfismos em seu gene podem estar associados a maior suscetibilidade e/ou gravidade em doenças, devido aos diferentes níveis de produção da citocina. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma técnica para a genotipagem dos polimorfismos de *IL16*: rs11556218, rs4072111 e rs4778889, para ser utilizada no laboratório de imunogenética da UEM.

Introdução

A interleucina 16 (IL-16) é uma citocina com propriedades imunoregulatórias e quimiotática de células T. A susceptibilidade e/ou gravidade de doenças entre os indivíduos podem ser atribuídas aos diferentes níveis de produção de citocinas, que são principalmente relacionados aos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes codificadores de citocinas.[1] Dentre os principais SNPs encontrados no gene da *IL-16* estão: rs4778889 T>C, rs11556218 T>G, rs4072111 C>T.[2] Vários autores já associaram polimorfismos no gene da *IL16* com doenças como osteoartrite do joelho[2] e câncer de células renais[3]. Devido à escassez de métodos moleculares com baixo custo, disponíveis para a genotipagem de *IL16*, o objetivo dessa pesquisa foi o aperfeiçoamento e implantação da técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para detecção dos polimorfismos do gene da *IL-16* no Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM).

Material e Métodos

Os iniciadores, enzimas de restrição e condições de ciclagem utilizados para reação de PCR-RFLP foram os mesmos utilizados por Luo et al 2015. As reações de amplificação e digestão enzimática foram inicialmente realizadas em volume final de 20 µl. Para a reação de amplificação foram utilizados 0,2 mM de DNTP, 2,5 mM de MgCl2, 2 ng de cada primer e 1 U, Taq polimerase (Invitrogen, USA), tampão 1X e 100 a 150 ng de DNA. Para a digestão enzimática foram utilizados 2,5U das enzimas apropriadas (LUO et al, 2015). Os resultados obtidos foram observados em gel de agarose a 3%. A digestão enzimática foi testada em diferentes períodos de tempo (1h, 3h, 4h e 16h). Para validação da técnica, foi realizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg que avalia a distribuição dos genótipos em um grupo de indivíduos.

Resultados Obtidos

O resultado da genotipagem de IL16 foi satisfatório, entretanto, com o objetivo de redução de custos, os volumes das reações de PCR e da digestão enzimática foram diminuídos para 10 µl. A diminuição do volume final de reação não afetou a reprodutibilidade dos resultados, permitindo a padronização de um método mais econômico. O melhor resultado foi obtido quando a digestão foi feita durante um período de 16h. Para avaliar se a distribuição dos genótipos para os SNPs rs11556218, rs4072111 e rs4778889 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram utilizadas as genotipagens de amostras de pacientes com doença periodontal crônica e de indivíduos saudáveis, totalizando 100 amostras para rs11556218 e rs4072111 e 148 para rs4778889. Em todos os SNPs analisados a distribuição dos genótipos estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Conclusão

Foi padronizada a técnica de PCR-RFLP para genotipagem dos SNPs rs11556218, rs4072111 e rs4778889 do gene *IL16*, de forma econômica e viabilizando sua utilização no LIG-UEM para futuras pesquisas envolvendo esses polimorfismos.

Agradecimentos

Agradecimento especial ao Cnpq pelo financiamento da pesquisa.

[1]Honsawek S.; Deepaisarnsakul B.; Tanavalee A.; Yuktanandana P.; Bumrugpanichthaworn P.; Malila S. Association of the IL-6 -174G/C gene polymorphism with knee osteoarthritis in a Thai population. Genet Mol Res. **2011**, 10: 1674–1680.

[2]Luo, S.X.; Li, S.; Zhang, X.H.; Zhang J.J.; Long, G.H.; Dong, G.F.; Su, W.; Deng, W.; Liu, Y.; Zhao, J.M.; Qin, X. Genetic Polymorphisms of Interleukin-16 and Risk of Knee Osteoarthritis. **2015**.

[3]Wang, Z.; Xu, Y.; Zhu, S. Interleukin-16 rs4778889 polymorphism contributes to the development of renal cell cancer in a Chinese population. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, **2015**.