



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Comunicação breve

Estudo caso-controle do polimorfismo do gene receptor da vitamina D em pacientes paquistaneses com artrite reumatoide



Case-control study of vitamin D receptor gene polymorphism in Pakistani rheumatoid arthritis patients

Peter John^{a,*}, Attya Bhatti^a, Noor ul Ain^a, Tahir Iqbal^b,
Tayyaba Sadaf^a e Javed Mehmood Malik^c

^a National University of Sciences & Technology (NUST), Atta-Ur-Rahman School of Applied Biosciences (ASAB), Department of Healthcare Biotechnology, Islamabad, Paquistão

^b Shifa Tameer-e-Millat University (STMU), Faculty of Medicine, Islamabad, Paquistão

^c Arthritis Research Center, Rahmat Noor Clinic, Rawalpindi, Paquistão

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 13 de maio de 2014

Aceito em 28 de janeiro de 2015

On-line em 6 de julho de 2015

Introdução

Artrite reumatoide (AR) é a doença inflamatória crônica mais comum. Caracteriza-se pela formação de autoanticorpos e destruição progressiva das articulações. Em pacientes com AR, a membrana sinovial fica primariamente afetada, mas a doença também pode afetar outros órgãos.¹ AR é uma doença devastadora e de comum ocorrência, com prevalência de aproximadamente 1% na população mundial e de 0,14-0,3% na população paquistanesa; as mulheres são afetadas três vezes mais frequentemente do que os homens.² Ainda se desconhece a etiologia exata da AR, mas depende da interação de uma série de fatores ambientais e genéticos.³ Nos últimos

anos, foi observado um papel crucial da vitamina D, um hormônio secosteroide que desempenha atividades através do VDR, e do próprio VDR na imunomodulação; assim, selecionamos o gene VDR com o objetivo de investigar seu impacto na suscetibilidade à AR. A proteína VDR é translacionada do gene VDR, que é extremamente polimórfico. As quatro variantes do gene VDR, rs2228570 no éxon 2, rs1544410, rs7975232 no íntron 8 e rs731236 no éxon 9, já foram amplamente estudadas; sabe-se também que essas variantes estão associadas a doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, doença de Addison, diabetes do tipo I e AR.⁴

O estudo das diferenças na distribuição genotípica ajudaria a identificar as consequências da variação étnica dos alelos, por causa de diferentes *backgrounds* genéticos, e, além disso,

* Autor para correspondência.

E-mail: pjohn@asab.nust.edu.pk (P. John).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2015.01.008>

0482-5004/© 2015 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Tabela 1 – Características gerais da população estudada

Características	Casos (n = 100)	Controles (n = 100)
Homens	37	31
Mulheres	63	69
Idade (média)	44,2	43

dos elementos ambientais dissimiles. Este estudo também ajuda na interpretação e detecção da variabilidade fenotípica em termos de gravidade da doença. Com base nas distinções genotípicas, seria possível uma interpretação biológica por estudos de associação da doença. O polimorfismo rs1544410, localizado no íntron nas proximidades da região 3' UTR, afeta o nível de transcrição do gene VDR, a estabilidade do transcrito e as modificações pós-transcricionais.⁵ Alguns dados previamente publicados demonstraram significância funcional na distribuição do genótipo rs1544410; em continuidade, nosso estudo pretendeu avaliar a associação do polimorfismo do VDR com AR em nossa população. É premente a necessidade de descobrir marcadores de risco genéticos potenciais de suscetibilidade à AR em nossa população paquistanesa, mas tal trabalho ainda não tinha sido feito para pacientes paquistaneses com AR.

Materiais e métodos

Foram recrutados para este estudo de caso-controle 100 pacientes e 100 controles saudáveis (indivíduos assintomáticos) equiparados para idade e gênero (tabela 1). Os pacientes que atendiam aos critérios de classificação de 2011 do American College of Rheumatology (ACR-2011) foram diagnosticados por reumatologistas da Rehmat Noor Clinic, Rawalpindi, que trabalharam em colaboração com nosso grupo de pesquisa. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ASAB-NUST e seguiu as orientações da Declaração de Helsinque; foi obtido consentimento informado. Amostras de sangue de todos os pacientes com AR e também dos controles saudáveis foram coletadas em tubos contendo 0,5M EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Investigamos o polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* – SNP) causador de troca de nucleotídeo único, de guanina (G) do alelo de maior frequência para adenina (A) do alelo de menor frequência, com o objetivo de verificar a presença de polimorfismo em nossa população.

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue coletadas com o uso do método do fenol-clorofórmio, com quantificação por nanogotas (Eppendorf™ Biophotometer

Plus). Foram usados dois *forward primers* e um *primer reverso* comum (VDR-F1- 5'GCCACAGACAGGCTGCG3', VDR-F2- 5'GCCACAGACAGGCTGCA3', VDR-R- 5'GTCACCTGCACATTGCTCCAA3') manualmente desenhados para a genotipagem da variante não codificante do gene VDR (rs1544410) e foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) e amplificação pelo sistema de mutação refratária (ARMS-PCR). Os produtos da PCR foram visualizados em agarose gel a 2% em seguida à amplificação em um termociclador 2.720 de 96 poços (Applied Biosystems). A análise estatística foi feita com o software Graphpad Prism 6V; os testes do qui-quadrado (X^2) e exato de Fisher bicaudal foram aplicados para uma análise da associação do polimorfismo rs1544410 em nossa população. Calculamos a *odds ratio* (OR) com um intervalo de confiança de 95%; e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Os cálculos para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) feitos para o grupo de controle não revelaram diferença significativa entre os valores observados e os valores esperados, com um valor de $p = 0,0034$, o que demonstra inserção em EHW. Isso sugere que não ocorreu desvio significativo nas frequências dos alelos observados nos pacientes, em comparação com os controles; portanto, os dois grupos se mostraram apropriados para uma análise mais aprofundada e para estudos associativos. A frequência de todos os genótipos possíveis também não demonstrou qualquer diferença em pacientes e indivíduos saudáveis (tabela 2 e figura 1A). Chegou-se a um valor de $X^2 = 5,662$ com uma probabilidade de erro (valor $p = 0,0590$). As frequências alélicas para pacientes com AR também não foram significativamente diferentes dos controles (tabela 2 e figura 1B). Os resultados observados indicaram a não existência de uma associação significativa entre SNP e AR. Portanto, nossos dados nulificaram qualquer associação significativa do polimorfismo do gene VDR com AR em nossa população. Também foi estudada uma associação específica para gênero com rs1544410, mas não foi demonstrada associação significativa entre mulheres e homens com AR (dados não mostrados).

Discussão

Nos últimos anos, o polimorfismo genético tem sido um dos mais discutidos tópicos nas variações genômicas. AR é uma

Tabela 2 – Distribuição das frequências de genótipos e alelos em casos e controles

Genótipo	Frequências de genótipos		Teste de X^2			Alelo	Frequências de alelos		Estatística	
	Casos (n = 100)	Controles (n = 100)	Valor de X^2	gl	Valor P ($\alpha < 0,05$)		Casos (n = 100) (%)	Controles (n = 70) (%)	Odds ratio (OR) (IC de 95%)	Valor de p
GG	31,0	40,0	5,662	2	0,0590	G	56,0	66,0	0,6556 (0,4375-0,9825)	0,0513
GA	50,0	52,0					44,0	34,0		
AA	19,0	8,0					A			

gl, grau de liberdade.

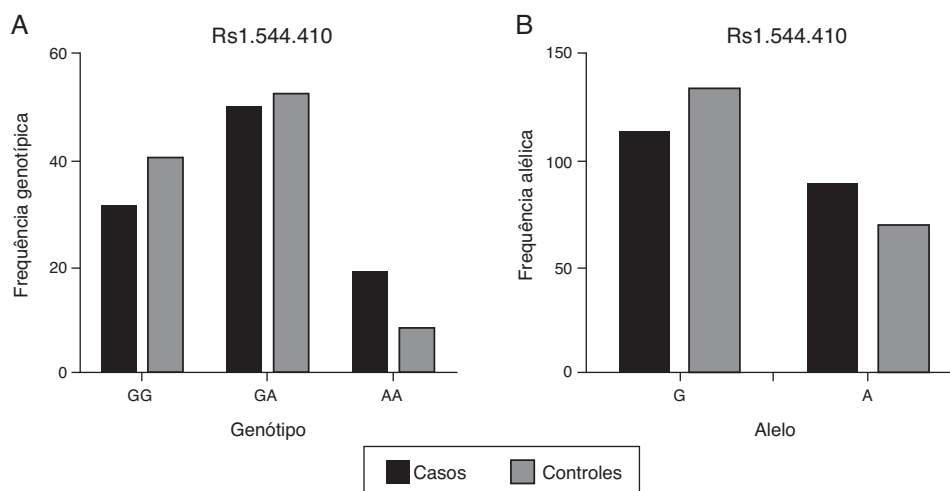


Figura 1 – A, Gráfico que ilustra a distribuição genotípica do polimorfismo do VDR (rs1544410) em pacientes com AR e em controles saudáveis. B, Gráfico que ilustra a distribuição alélica do polimorfismo do VDR (rs1544410) em pacientes com AR e em controles saudáveis.

doença inflamatória sistêmica que afeta ossos e cartilagens. A vitamina D exerce vários efeitos imunomoduladores e, portanto, pode desempenhar algum papel no curso das doenças autoimunes.⁶ Foi determinada considerável associação entre insuficiência de vitamina D e aumento da ocorrência de transtornos autoimunes.⁷ Foi observado que, em pacientes com AR, os linfócitos expressam VDR.⁸ No citoplasma, a forma hidroxilada da vitamina D (1,25[OH₂]D) se liga ao VDR e prossegue então em direção ao núcleo, onde irá aumentar a transcrição de genes dependentes da vitamina D, que é essencial para o metabolismo do cálcio e dos ossos,⁹ e também inibirá a proliferação dos linfócitos T e a liberação de citocinas Th1, como IL-2, IFN- γ e TNF- α .¹⁰ Diversos estudos demonstraram que o risco de doença autoimune vem aumentando devido à deficiência de vitamina D; além disso, foi observada melhoria clínica considerável em pacientes com AR tratados com vitamina D.¹¹ Em nosso estudo, a investigação do polimorfismo rs1544410 do gene VDR não revelou diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas e alélicas de pacientes com AR e de controles saudáveis. Nossas observações estão em concordância com os achados de Maalej et al.,¹ que demonstraram não haver associação do polimorfismo rs1544410 com a ocorrência de AR em populações francesas e tunisinas. No entanto, esse polimorfismo foi associado a outras doenças autoimunes, como a diabetes do tipo 1 (T1D) em muitos países, inclusive em populações diferentes como as de Hungria, Japão, Grécia, Bangladesh, Taiwan e Chile.¹² Também foi observada uma associação significativa entre o polimorfismo rs1544410 e osteoporose.¹³ Além disso, foram conduzidos estudos em outras doenças autoimunes, como cirrose, hepatite, doença de Crohn, doença de Graves e esclerose múltipla. Foi observada associação de lúpus eritematoso sistêmico em pacientes japoneses e chineses com o polimorfismo rs1544410. Assim, o polimorfismo pode ser investigado em associação com outras doenças imunes.¹⁴ Foi observado que polimorfismos no gene VDR estão associados a um modo dependente de gênero, i. é, com maior prevalência em mulheres afetadas com AR.¹⁵ Uma

associação específica para gênero com rs1544410 em nosso grupo indicou que o polimorfismo não tem efeito dependente de gênero no caso de AR; e que não há ligação entre esse polimorfismo e aumento de incidência de AR entre mulheres.

Embora nossos achados não tenham revelado evidência de associação entre rs1544410 e AR em nossa população, é possível que existam outros polimorfismos identificados como fatores de risco para AR. É importante que outras moléculas implicadas na via inflamatória de AR sejam investigadas para uma associação genética com a patogênese dessa doença. Outros polimorfismos no gene VDR podem ter associação significativa com relação a AR; portanto, há necessidade de estudos em populações maiores, para que tal associação seja definida.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Esse estudo foi financiado pela Higher Education Commission.

REFERÊNCIAS

1. Maalej A, Petit-Teixeira E, Michou L, Rebai A, Cornelis F, Ayadi H. Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population. *Genes and Immunity*. 2005;6:707–11.
2. Dai SE, Han XH, Zhao DB, Shi YQ, Liu Y, Meng JM. Prevalence of rheumatic symptoms, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and gout in Shanghai, China: a Copcord study. *The Journal of Rheumatology*. 2003;30:2245–51.
3. Klareskog L, Padyukov L, Ronnelid J, Alfredsson L. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Current Opinions in Immunology*. 2006;18:650–5.

4. Kiran G, Debashish D. Vitamin D and rheumatoid arthritis: is there a link? *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2008;11:206-11.
5. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004;89-90(1-5):187-93.
6. Kaleta B, Bogaczewicz J, Robak E, Sysa-Jędrzejowska A, Wrzosek M, Szubierajska W, Woźniacka A. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism in Polish patients with systemic lupus erythematosus. *ISRN Endocrinology*. 2013.
7. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*. 2008;4:404-12.
8. Manolagas SC, Provvedini DM, Tsoukas CD. Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the immune system. *Molecular and Cell Endocrinology*. 1985;43(2-3):113-22.
9. Khazai N, Judd SE, Tangpricha V. Calcium and vitamin D: skeletal and extraskeletal health. *Current Rheumatology Reports*. 2008;10:110-7.
10. Lemire JM. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of Cell Biochemistry*. 1992;49:26-31.
11. Andjelkovic Z, Vojinovic J, Pejnovic N, Popovic M, Dujic A, Mitrovic D, et al. Disease modifying and immunomodulatory effects of high dose 1 alpha (OH) D3 in rheumatoid arthritis patients. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1999;17:453-6.
12. Chakhtoura M, Azar ST. The role of vitamin D deficiency in the incidence, progression, and complications of type 1 diabetes mellitus. *International Journal of Endocrinology*. 2013. Article ID 148673.
13. Pouresmaeili F, Jamshidi J, Azargashb E, Samangouee S. Association between vitamin D receptor gene BsmI polymorphism and bone mineral density in a population of 146 iranian women. *Cell Journal*. 2013;15:75-82.
14. Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin D receptor polymorphism with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2002;35:126-31.
15. Garcia-Lozano JR, Gonzalez-Escribano MF, Valenzuela A, Garcia A, Nunez-Roldan A. Association of vitamin D receptor genotypes with early onset rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunogenetics*. 2001;28:89-93.