



ANÁLISE *IN SILICO* DE VARIANTES DA INTERLEUCINA 10 (IL 10) CANDIDATAS A DOENÇAS AUTOIMUNES EM HUMANOS



<https://doi.org/10.56238/levv15n41-002>

Data de submissão: 30/08/2024

Data de publicação: 30/09/2024

Vitória Giovanna de Souza Cassiano

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

Nara Suzy Aguiar de Freitas

Doutora em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manuel de Medeiros, Dois Irmãos, Recife – PE, Brasil
E-mail: nara.safreitas@ufrpe.br

Maria Helena Queiroz de Araújo Mariano

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco
Universidade de Pernambuco
Rua Arnóbio Marques, Santo Amaro, Recife – PE, Brasil
E-mail: irpe.diretoria@gmail.com

Eliézer Rushansky

Pós-graduação em Clínica Médica pela Universidade de Pernambuco
Universidade de Pernambuco
Rua Arnóbio Marques, Santo Amaro, Recife – PE, Brasil
E-mail: eliezer.rushansky@upe.pe.gov.br

Maria de Mascena Diniz Maia

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manuel de Medeiros, Dois Irmãos, Recife – PE, Brasil
E-mail: maria.dmaia@ufrpe.br

RESUMO

A IL 10 é uma citocina com funções imunorreguladoras, atuando tanto na supressão quanto no estímulo do sistema imunológico. Polimorfismos na região promotora do gene IL 10 podem influenciar sua expressão e a produção de IL 10, que varia entre indivíduos devido a fatores genéticos. Utilizando ferramentas de bioinformática, o estudo analisou três variantes do gene e encontrou associações dessas com doenças autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e doença inflamatória intestinal. O estudo também investigou a filogenia do gene IL 10 em mamíferos, incluindo *Homo sapiens*, *Mus musculus* (camundongo), *Equus caballus* (cavalo), *Rattus norvegicus* (ratazana) e *Mesocricetus auratus* (hamster-sírio). A análise filogenética demonstrou que o gene IL 10 é altamente conservado entre as espécies, sugerindo que ele evoluiu a partir de um ancestral comum e tem sido preservado em consequência do seu valor adaptativo, sendo um gene conservado mesmo após evolução divergente entre as espécies estudadas. A análise da taxa dN/dS revelou uma seleção negativa, indicando que mudanças na sequência de aminoácidos foram evitadas pela seleção natural. Uma árvore filogenética foi construída utilizando o método de "Maximum Likelihood", revelando uma relação



estreita entre os genes de *R. norvegicus*, *M. musculus* e *M. auratus*, enquanto os genes de *H. sapiens* e *E. caballus* foram agrupados com alta confiabilidade. A pesquisa reforça a importância de compreender a evolução dos genes para a medicina comparativa e a classificação dos organismos, auxiliando na identificação de mudanças adaptativas entre genes homólogos.

Palavras-chave: Filogenia, Gene IL10, Polimorfismo, Doenças Autoimunes.

1 INTRODUÇÃO

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória produzida por vários tipos de células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos T e B, células dendríticas e mastócitos. O gene IL-10 nos humanos, está localizado no cromossomo 1q31-32 e é composto por cinco éxons e quatro íntrons. Essa interleucina tem papel importante na regulação da resposta imune, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulando a diferenciação de células T reguladoras (Silva, 2022).

A expressão e função das citocinas, como por exemplo da IL-10, podem ser afetadas por variantes genéticas capazes de alterar a estrutura ou a regulação dessas moléculas. Essas variantes podem ser classificadas em sinônimas, quando a substituição de nucleotídeos não altera o aminoácido codificado ou não sinônima ou missense quando uma substituição de nucleotídeos leva a uma substituição de aminoácidos que pode ou não resultar em uma variante patogênica dependendo do efeito da substituição de aminoácidos na função e estrutura da proteína (Borges, 2021). Algumas variantes missenses podem ser neutras, não afetando significativamente a proteína, enquanto outras podem ser prejudiciais, causando perda ou ganho de função, instabilidade, agregação ou interação anormal com outras moléculas (Costa, 2022).

A análise *in silico* é uma abordagem computacional que utiliza ferramentas bioinformáticas para prever o impacto das variantes genéticas na estrutura e função das proteínas. Essas ferramentas podem utilizar diferentes métodos, como a análise de conservação evolutiva, a modelagem molecular, a simulação de dinâmica, a análise de redes de interação ou a aprendizagem de máquina que podem ser úteis para identificar variantes missenses que estejam associadas a doenças autoimunes, que são condições caracterizadas por uma resposta imune anormal contra antígenos próprios do organismo. Essas doenças podem afetar vários órgãos e sistemas, como a pele, as articulações, o sangue, o sistema nervoso, o trato gastrointestinal e o sistema endócrino.

De forma semelhante, a análise filogenética é uma técnica crucial na biologia ao buscar entender as relações evolutivas entre diferentes organismos. Utilizando dados morfológicos, comportamentais e, principalmente, moleculares, essa análise permite a reconstrução da história evolutiva das espécies (Caldart et al., 2016). A importância da análise filogenética está na sua capacidade de elucidar como as espécies estão relacionadas e como evoluíram ao longo do tempo. Isso é essencial para a classificação dos seres vivos e para a compreensão da biodiversidade (Santos; Klassa, 2012). Além disso, a filogenia tem aplicações práticas em áreas como a virologia, a imunologia e epidemiologia molecular, onde é utilizada para rastrear a evolução de agentes patogênicos e entender a disseminação de doenças (Caldart et al., 2016).

Considerando o exposto, o presente artigo teve como objetivo investigar as mutações do gene IL10 a nível de nucleotídeo e aminoácido para verificar quais mutações são missenses usando a plataforma Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) e ainda analisar o grau de patogenicidade e

classificar em patogênica ou benigna as variantes missenses fornecidas pelos bancos de dados e visualizar a proteína IL 10 em 3D, destacando a posição dos aminoácidos onde ocorreu mutação. Por fim, utilizar o alinhamento das sequências gênicas das espécies de mamíferos placentários *Homo sapiens* (humano), *Mus musculus* (camundongo ou rato-doméstico), *Equus caballus* (cavalo), *Rattus norvegicus* (Twister) e um mamífero marsupial *Mesocricetus auratus* (Hamster Sírio) a fim de analisar as possíveis similaridades e o tipo de pressão predominante ao longo da história evolutiva expondo os resultados em uma árvore filogenética.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 FERRAMENTAS UTILIZADAS

Ensemble: é um navegador de genomas de vertebrados que oferece suporte para pesquisas em genômica comparativa, evolução, variações em sequências e regulação da transcrição. Essa plataforma permite verificar anotações de genes, gerar alinhamentos múltiplos, prevê funções regulatórias e reúne dados relacionados a doenças. Entre as ferramentas disponíveis no Ensembl estão BLAST, BLAT, BioMart e o preditor de efeito de variantes (VEP), abrangendo todas as espécies que ele suporta.

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis é um software de bioinformática amplamente utilizado para análises estatísticas de dados de sequências moleculares para a construção de árvores filogenéticas. Oferece uma variedade de ferramentas para alinhar sequências, calcular distâncias evolutivas, inferir filogenias usando diversos métodos, como Máxima Verossimilhança, Máxima Parcimônia e Método dos Neighbour-Joining, além de realizar testes estatísticos para avaliar hipóteses sobre evolução molecular.

NCBI: National Center for Biotechnology Information fornece acesso a uma grande variedade de bases de dados biológicas, ferramentas de análise de dados e recursos de pesquisa, incluindo o GenBank, uma das maiores coleções de sequências genômicas do mundo. Além disso, o NCBI desenvolve e mantém ferramentas de software como BLAST para a comparação de sequências, e oferece plataformas como o PubMed, que permite o acesso a uma vasta biblioteca de artigos científicos na área biomédica.

Mutation Assessor: prevê o impacto funcional de substituições de aminoácidos em proteínas, como mutações identificadas em câncer ou polimorfismos missense. A avaliação do impacto funcional é feita com base na conservação evolutiva do aminoácido alterado em proteínas homólogas. Esse método foi validado em um extenso conjunto de variantes polimórficas e associadas a doenças (OMIM), abrangendo cerca de 60 mil variantes.

SIFT: analisa se uma substituição de aminoácido afeta a função de uma proteína com base na homologia de sequência e nas propriedades físicas dos aminoácidos. O SIFT pode ser aplicado tanto a

polimorfismos não-sinônimos, que ocorrem naturalmente, quanto a mutações missenses induzidas em laboratório.

Polyphen 2: ferramenta que prevê o possível impacto de uma substituição de aminoácido na estrutura e função de uma proteína humana, utilizando considerações físicas e comparativas diretas.

2.2 EXECUÇÃO DA ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os dados sobre o gene IL-10 dos respectivos mamíferos: *Homo sapiens* (humano), *Mus musculus* (camundongo ou rato-doméstico), *Equus caballus* (cavalo), *Rattus norvegicus* (Twister) e um exemplo de mamífero marsupial *Mesocricetus auratus* (Hamster Sírio) foram extraídos do banco de dados Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) e do banco de dados do National Center for Biological Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Foram pesquisados um a um selecionando o cDNA e optando pela região codificante do gene a fim de facilitar a identificação da proteína IL-10 no código genético. Os arquivos foram salvos para serem alinhados e para isto foi utilizado o software MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics) disponível em: (<https://www.megasoftware.net/>). As sequências de nucleotídeos coletadas anteriormente foram carregadas em “multiple” em um único arquivo que continha apenas as regiões “Cds” ou regiões codificantes no programa MEGA 11. O alinhamento foi realizado pelo software, sendo possível observar todas as semelhanças e divergências entre as sequências de cada espécie. Uma matriz de similaridade foi gerada pelo MEGA 11 (Tabela 1) e a Estimativa Máxima de Verossimilhança (EMV) que estima os parâmetros da matriz, que geralmente incluem as taxas de transição e transversão entre as bases. Esses parâmetros representam a probabilidade de uma base ser substituída por outra ao longo do tempo (ScienceDirect Topics, 2024).

Na EMV (Tabela 1), cada entrada mostra a probabilidade de substituição (r) de uma base (linha) para outra base (coluna) (Tamura, 2004). Para simplificar, a soma dos valores de r é igual a 100. As taxas de diferentes substituições transicionais são mostradas em negrito e as de substituições transversais são mostradas em itálico. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão aos pares). Foi verificado um total de 750 posições no conjunto de dados final. Partindo do mesmo alinhamento, obtivemos uma nova tabela (Tabela 2) onde a diferença entre as distâncias não-sinônimas e sinônimas por local entre sequências é mostrada. As análises foram realizadas utilizando o modelo Kumar (Kumar, 2000). Esta análise envolveu 5 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão aos pares). Foram observadas um total de 178 posições no conjunto de dados final (Tabela 2). O método utilizado para calcular foi o Kumar, modelo Kimura 2 comparando as taxas de substituição entre as sequências ortólogas. Por fim, as sequências foram submetidas ao teste de filogenia usando o “Bootstrap method” e a criação da árvore evolutiva usando as seguintes

configurações: selecionando as substituições de nucleotídeos usando o modelo “Tamura-nei” com o número de replicações em 1000.

Uma árvore filogenética foi gerada utilizando o software MEGA que consiste em um diagrama capaz de mostrar as relações evolutivas entre os organismos estudados, construídas baseadas nas hipóteses apresentadas pelos algoritmos do software mencionado, utilizado para o alinhamento. A árvore foi gerada a partir do método “Maximum likelihood tree” de acordo com o modelo de Tamura-nei que utiliza os padrões de verossimilhança já mencionados anteriormente bem como os padrões de máxima parcimônia, ou seja, os principais marcadores moleculares observados foram utilizados para reunir os grupos com base nas principais semelhanças entre o gene da IL-10, nas espécies estudadas.

2.3 EXECUÇÃO DA ANÁLISE DE VARIANTES

Para analisar os diferentes tipos de variantes e as consequências destas para a função da IL-10, buscamos no software Ensemble a sequência cDNA do gene da IL-10 humano e selecionamos o transcrito IL 10-206 (ENST00000659642.2) o qual é composto por 6 éxons, 13 domínios e aproximadamente 2911 alelos dos quais foram selecionadas as variantes: rs750010814, rs1674874871 e rs568879359 para serem submetidas a testes nos softwares Mutation Assessor, Polyphen 2 e SIFT, cujos resultados foram elencados em tabelas para melhor compreensão destes. O Mutation assessor, o Polyphen 2 e o SIFT são ferramentas de bioinformática que preveem o impacto funcional de substituições de aminoácidos nas proteínas, avaliado com base na conservação evolutiva do aminoácido afetado em homólogos de proteína, usando considerações físicas e comparativas diretas. O uso de diferentes ferramentas nos auxilia a analisar e comprovar ou não a probabilidade de um potencial deletério entre as variantes estudadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o alinhamento e correção das sequências das cinco espécies estudadas, pode-se observar a existência de 537 regiões entre elas, das quais 387 estavam conservadas em 100%, ou seja, quando observamos uma região conservada quer dizer que estava presente nas espécies ancestrais comuns e foi preservada nas espécies contemporâneas que foram submetidas à análise. A conservação plena de uma região indica que esta foi mantida pela seleção natural. No entanto, um nucleotídeo idêntico em uma determinada posição pode ter sido preservado devido à seleção contra alteração na sequência, mas nem todos os caracteres conservados podem ser funcionais (Mayr, E. 1982). De semelhante modo, foi possível observar a existência de 150 regiões variáveis que consistem em segmentos específicos da molécula de DNA, o que exibe variações entre os indivíduos. Essas variações podem envolver mutações, inserções ou deleções de bases que podem estar associadas a genes específicos, reguladores ou outras funções biológicas (Cruzito, 2024).

As regiões com variações são fundamentais durante o processo evolutivo pois permite que as espécies se adaptem a ocasiões adversas além de que, variações percebidas como benéficas para o organismo vão se tornando comuns nas populações, visto que podem significar vantagens sobre outras. Foi possível ainda observar a ocorrência de regiões chamadas informativas de parcimônia ou regiões “parsim-info,” que consistem em regiões onde nucleotídeos substituídos em comum estão presentes em pelo menos duas espécies, que podem indicar características adquiridas em comum e mantidas ao longo da história evolutiva por serem importantes para a função da proteína e assim, são importantes para agrupá-las em uma árvore filogenética. Cerca de 84 regiões “singleton” ou de “SNPs” foram identificadas e são caracterizadas por manifestar a substituição de um único nucleotídeo em um indivíduo ou em uma pequena população. Em regiões codificantes as SNPs são subclassificadas em sinônimas quando o polimorfismo não resulta na alteração do aminoácido codificado, enquanto as não sinônimas provocam esta alteração.

A função de uma verossimilhança é construída com base nos dados observados (sequências de DNA) e mede a probabilidade de observar os dados sob o modelo com os parâmetros estimados. Os valores estimados dos parâmetros da matriz indicam as taxas relativas de substituição entre as bases e calcula um percentual médio estimado das ocorrências de substituições entre estas considerando o alinhamento realizado entre as cinco espécies. Por exemplo, um valor alto para a taxa de transição de A para G sugere que essa substituição ocorre frequentemente. Os resultados mostrados na Tabela 1 indicam as frequências de nucleotídeos onde A= 28,27%, T/U =21,34%, C= 24,95% e G = 25,44%.

Tabela 1. Estimativa de máxima verossimilhança da matriz de substituição e total das frequências de nucleotídeos (A), (T/U), (C) e (G).

	A	T	C	G	TOTAL
A	-	4,01	4,69	20,05	28,27%
T	5,31	-	10,83	4,78	21,34%
C	5,31	9,26	-	4,78	24,95%
G	22,28	4,01	4,69	-	25,44%

Fonte: MEGA 11 / dados da pesquisa.

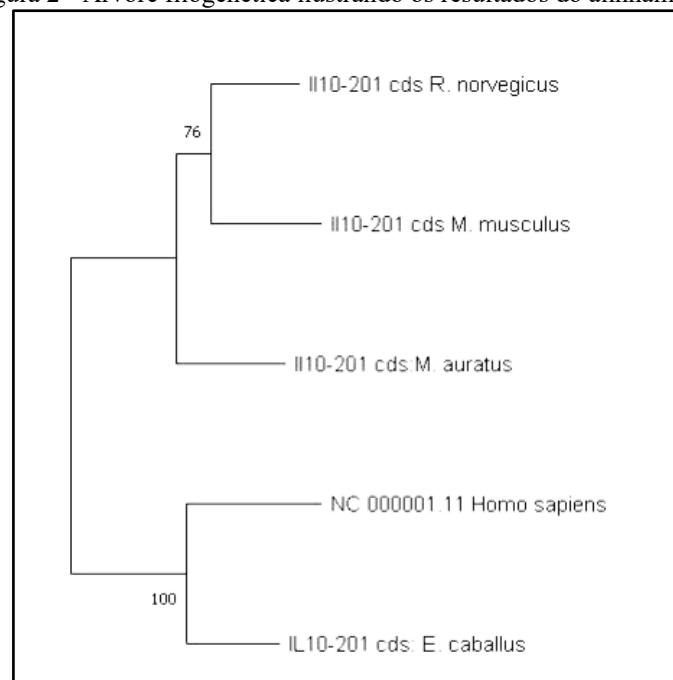
Na Figura 1 são mostrados os valores das assinaturas seletivas onde $\omega = dN/dS$ em um gráfico que representa a razão entre as mutações não sinônimas e as mutações sinônimas entre os genes submetidos ao alinhamento. Os valores achados para cada espécie foram: H.sapiens/M.musculus (-0,2265), H. sapiens/R.norvegicus (-0,1938), H.sapiens/M.auratus (-0,1814), H.sapiens/E.caballus (-0,0978), R.norvegicus/M.musculus (-0,1027), R.norvegicus/M.auratus (-0,1215), R.norvegicus/E.caballus (-0,1907), M.auratus/M.musculus (-0,1191), M.auratus/E.caballus (-0,2546), E.caballus/M.musculus (-0,2431). Esses dados encontrados sugerem que o gene IL -10 esteja sob pressão da seleção negativa ou purificadora visto que todos os valores encontrados foram inferiores a um (<1) e a seleção negativa vai atuar na direção oposta, reduzindo a frequência ou até mesmo eliminando mutações deletérias das populações ao longo do tempo (Hartl; Clark, 1997).

Fig 1. Cálculo da taxa de dN/dS entre as sequências analisadas.

	H. sapiens	M. musculus	R. norvegicus	M. auratus	E. caballus
H. sapiens					
M. musculus	-0,2265				
R. norvegicus	-0,1938	-0,1027			
M. auratus	-0,1814	-0,1191	-0,1215		
E. caballus	-0,0978	-0,2431	-0,1907	-0,2546	

Para a construção da árvore filogenética (Figura 2), foi utilizado o nº 1000 de replicações “Bootstrap” como parâmetro que reuniu como “grupo irmão” com 76% de confiabilidade sugerindo uma diversidade maior na sequência do gene estudado entre o grupo de roedores R.norvegicus, M.musculus e M.auratus. Enquanto os genes das H.sapiens e E.caballus continuaram altamente conservadas ontogeneticamente, mesmo após a divergência evolutiva entre ambos grupos, visto que foram encontradas mais similaridades nos genes já que o software reuniu com 100% de confiabilidade nas replicações realizadas.

Figura 2 - Árvore filogenética ilustrando os resultados do alinhamento.



Na plataforma Ensemble foi possível identificar a existência de 139 variantes SNPs no transcrito IL 10-206 (ENST00000659642.2) do gene da interleucina 10. Para este trabalho, três variantes não sinônimas (Tabela 2) foram selecionadas para serem submetidas a análises nos softwares para verificar os danos que possíveis mutações poderiam causar à estrutura e função da proteína. As variantes foram submetidas às ferramentas bioinformáticas para determinar se estas eram neutras ou deletérias de acordo com a pontuação indicada pelos softwares indicados na tabela 2. De acordo com Nykamp et al. (2017) uma variante é patogênica se interrompe um produto genético de uma forma que

leva à doença humana e é benigna se tem um efeito que não leva à doença em mesmo que uma única base possa alterar um aminoácido e causar um efeito pleiotrópico. Nos softwares Mutation assessor, Polyphen 2 e SIFT as variantes rs750010814, rs1674874871 e rs568879359 apresentaram pontuações que indicam possibilidade significativa de risco durante a formação de proteínas que podem resultar em alterações na estrutura e função da proteína e conseqüentemente resultar em doenças (Tabela 2).

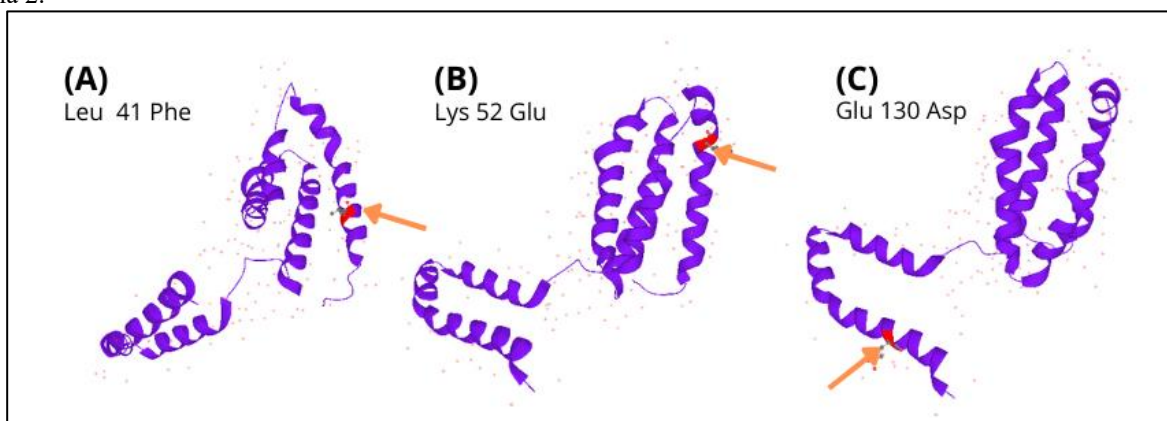
Tabela 2 - Variantes do gene IL 10 humano para comparação e análise in silico quanto a patogenicidade.

rs ID	Éxon	Subs. Nt	Sub.Aa	Alelo	MAF	Mutation Assessor	Polyphen2	SCORE	SIFT	SCORE
rs750010814	2	G>A	L41F	G	<0.01	deletério	0.919	0.998	deletério	0.01
rs1674874871	2	T>C	K52E	T	<0.01	deletério	0.919	0.995	deletério	0
rs568879359	6	A>C	E130D	T/G	<0.01	deletério	0.919	0.989	deletério	0.03

Fonte: dados da pesquisa.

Podemos observar ainda um modelo 3D (Figura 3) com 85% da estrutura da proteína que indica exatamente onde houve a substituição do aminoácido nas respectivas variantes. Estudos dos últimos anos mostram que o alelo C da rs568879359 esteve presente em uma análise que o associou a pacientes com distúrbios de imunodeficiências primárias (Chi et al., 2018). Outros trabalhos associaram a IL 10 sendo utilizada em sua forma íntegra como terapia gênica no tratamento de artrite reumatóide. (Keystone et al., 1998).

Figura 3 - Modelo 3D indicando localização onde ocorreu a troca de aminoácidos em cada variante de acordo com a Tabela 2.



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise in silico nesse estudo, sugeriu que as variantes as rs750010814, rs1674874871 e rs568879359 do gene IL10, apontam associação a um potencial deletério devido a alterações estruturais e funcionais geradas na proteína podendo ser utilizadas como marcadores de risco para doenças autoimunes. Em relação a análise filogenética para o gene IL 10 nas espécies estudadas, dois clados na árvore filogenética apresentaram relação entre as espécies, com o teste de confiabilidade de



76% para *R.norvegicus*, *M.musculus* e *M.auratus* e 100% para *H.sapiens* e *E.caballus* sendo esta relação altamente conservada entre as espécies, sugerindo que este evoluiu a partir de um ancestral comum e tem sido preservado em consequência do seu valor adaptativo, sendo um gene conservado mesmo após evolução divergente entre as espécies estudadas Logo, podemos constatar que a filogenia molecular como ramo da filogenia é uma ferramenta crucial para obter informações sobre as relações evolutivas entre os organismos. Portanto, é possível que o gene para 'IL 10' tenha o mesmo valor seletivo para os sistemas imunológicos tanto dos cavalos como dos humanos, permitindo que ambos se defendam contra patógenos (vírus, fungos, parasitas, bactérias, etc.) de forma semelhante, tanto como uma resposta imune inata como de uma resposta imune adaptativa, de acordo com seus padrões evolutivos.



REFERÊNCIAS

BORGES, P. Comparação de ferramentas in silico para avaliação de patogenicidade de variantes missense. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/250399>.

CALDART, E. T.; MATA, H.; CANAL, C. W.; RAVAZZOLO, A. P. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 44, p. 1392, 2016.

CHI, Z. H. et al. Técnica de sequenciamento de alto rendimento direcionada para o diagnóstico molecular de distúrbios de imunodeficiência primária. *Medicina*, v. 97, n. 40, p. e12695, out. 2018. DOI: 10.1097/md.0000000000012695.

COSTA, M. F. Análise dos métodos in silico frente à estudo in vivo: uma revisão integrativa. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2022. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/20649/1/MFCosta.pdf>

CRUZITO. Regiões não codificantes de DNA: sequências e explicação. Disponível em: <https://pt.estudyando.com/regioes-nao-codificantes-de-dna-sequencias-e-explicacao/>.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, v. 174, n. 5, p. 1209–1220, 1 nov. 1991.

HARTL, D.; CLARK, A. G. *Principles of Population Genetics*. 3rd ed. Sinauer Associates, 1997.

KEYSTONE E, WHERRY J, GRINT P. IL-10 as a therapeutic strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 1998 Aug;24(3):629-39. doi: 10.1016/s0889-857x(05)70030-2. PMID: 9710891.

KOSIOL, C.; ANISIMOVA, M. Selection Acting on Genomes. *Methods in Molecular Biology*, p. 373–397, 2019.

Maximum Likelihood Method - an overview | ScienceDirect Topics. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/maximum-likelihood-method>. Acesso em: 18 de Março de 2024.

MAYR, E. Speciation and macroevolution. *Evolution*, v. 36, n. 6, p. 1119–1132, nov. 1982.

NEI, M.; KUMAR, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press, 2000.

NYKAMP, K. et al. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG–AMP variant classification criteria. *Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, v. 19, n. 10, p. 1105–1117, 2017.

SANTOS, C. M. D.; KLASSA, B. Sistemática filogenética hennigiana: revolução ou mudança no interior de um paradigma? *Scientiae Studia*, v. 10, p. 593–612, 2012.



SARAIVA M, VIEIRA P, O' GARRA A.. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med.* 2020 Jan 6;217(1):e20190418. doi: 10.1084/jem.20190418. PMID: 31611251; PMCID: PMC7037253.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, v. 101, p. 11030-11035, 2004.

YAO Y, SIMARD AR, SHI FD, HAO J. IL-10-producing lymphocytes in inflammatory disease. *Int Rev Immunol.* 2013 Jun;32(3):324-36. doi: 10.3109/08830185.2012.762361. Epub 2013 Apr 25. PMID: 23617759.

YIN Z, BAHTIYAR G, ZHANG N, LIU L, ZHU P, ROBERT ME, MCNIFF J, MADAIO MP, CRAFT J. IL-10 regulates murine lupus. *J Immunol.* 2002 Aug 15;169(4):2148-55. doi: 10.4049/jimmunol.169.4.2148. PMID: 12165544.