



ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES *TOLL-LIKE* COM A HANSENÍASE

Andressa Higa Shinzato (PIBIC/CNPq-FA/Uem), Mariane Higa Shinzato, Priscila Saamara Mazini, Hugo Vicentin Alves, Julimary Suematsu Aquino, Ana Maria Sell, Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientadora), e-mail: jelvisentainer@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas- Imunologia

Palavras-chave: Hanseníase, genes *Toll-like*, resposta imune inata.

Resumo:

A hanseníase é uma imunopatologia causada pelo *Mycobacterium leprae*, a qual pode ser classificada em lepromatosa (LL), dimorfa ou borderline (DD), tuberculoide (TT) e intermediária. A Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda classifica os pacientes em paucibacilares, no caso dos pacientes com até 5 lesões cutâneas e em multibacilares, os casos com mais de 5 lesões. Suas manifestações clínicas dependem da interação entre a micobactéria e o sistema imune do indivíduo. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra o bacilo, destacando nessa resposta, os receptores Toll-like (TLR) expressos pelas células Natural Killer. As lipoproteínas presentes no bacilo são reconhecidas por esses receptores, levando à diferenciação dos monócitos em macrófagos e em células dendríticas CD1b+, que por sua vez ativam linfócitos os quais liberam citocinas como TNF-alfa e IL-12 promovendo uma ação antibactericida. O objetivo deste estudo foi comparar a frequência dos genes *Toll-like* entre pacientes e controles das regiões Norte/Noroeste do Paraná. Os resultados mostraram que polimorfismos em determinada posição do gene *TLR4* e do gene *TLR9* estão relacionados ao desenvolvimento da doença. Devido à grande miscigenação brasileira e o fato da hanseníase ser uma doença negligenciada, fazem-se necessários outros estudos que confirmem os achados.

Introdução



A hanseníase é uma imunopatologia causada pelo microrganismo intracelular *Mycobacterium leprae*. O fenótipo de susceptibilidade à infecção pelo *M. leprae* é complexo e é influenciado por fatores do hospedeiro e do parasita e, também, pelas condições ambientais. A resposta imune inata, que constitui a primeira linha de defesa contra o *M. leprae*, é considerada etapa crucial para o desenvolvimento da resposta contra o bacilo, visto que possui componentes efetores essenciais no combate ao patógeno, e é capaz de direcionar a imunidade adaptativa (MODLIN, 2009). Diversas células do sistema imune são ativadas por meio de seus receptores para gerar uma resposta antigênica, como células Natural Killer, linfócitos, dentre outras.

Dentre os receptores expressos pelas células Natural Killer, destacam-se na resposta imune inata, os receptores Toll-Like, que estão presentes na superfície celular (TLR1, 2, 4, 5, 6), e também no citoplasma (TLR 3, 7, 8, 9). Cada membro da família TLR é ativado por antígenos específicos que levam a diferentes perfis de ativação de transcrição, iniciando uma resposta imune adequada ao patógeno (JOHNSON et al., 2007). Estes receptores polimórficos reconhecem lipoproteínas presentes no bacilo e promovem a diferenciação de monócitos em macrófagos e em células dendríticas CD1b+, que por sua vez ativam linfócitos que liberam citocinas como TNF-alfa e IL-12 promovendo uma atividade antimicrobicida. O *M. Leprae* inicia a sinalização celular por meio da ativação do heterodímero TLR1\TLR2 (KRUTZIK et al., 2003). Alterações nestes genes conferem susceptibilidade à hanseníase e muitos estudos relataram a influência dos genes Toll-Like na hanseníase. Sendo assim, este projeto teve por objetivo comparar as frequências dos genes Toll-Like entre pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis não aparentados das regiões Norte/Noroeste do Paraná.

Materiais e métodos

Neste estudo caso-controle, foram utilizadas 200 amostras de sangue periférico de pacientes com hanseníase, tratados no Centro de Especialidades do SUS da cidade de Maringá (CISAMUSEP), Paraná. O grupo controle foi composto por 200 indivíduos. A extração do DNA foi realizada utilizando a técnica *salting out* com algumas modificações (CARDOZO et al., 2009). Os genes Toll-Like foram genotipados pela técnica PCR-SSP (*polymerase chain reaction - sequence-specific*) e após, foi observado o produto amplificado em gel de eletroforese. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas com o software estatístico OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, versão 2.3.1 (<http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>), pelo método quiquadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher. A



determinação de odds ratio (OR) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram calculados de acordo com o método de Woolf, com o software estatístico OpenEpi, versão 2.3.1, para determinar, o risco de desenvolver a doença.

Resultados e Discussão

Foram analisadas as frequências dos alelos encontrados para os genes TLRs 1, 2, 4, 5, 7 e 9. A análise dos genes *TLR1*, *TLR2*, *TLR5*, *TLR7* e da posição 3211 do gene *TLR4* não mostrou valores de p significativos. Por outro lado, a análise da posição 3192 do gene *TLR4* e da região do gene *TLR9*, mostrou resultados estatisticamente significativos, conforme visualizados nas Tabelas 1 e 2. Na análise da posição 3192 do gene *TLR4*, a frequência do alelo C mostrou-se aumentada no grupo controle (84,64% vs 69,16%, $p=0,0001$; $OR=0,41$). O alelo A, por sua vez, estava aumentado no grupo dos pacientes ($p=0,0001$, $OR=2,46$, $IC=1,62-3,72$), sugerindo um risco à hanseníase. O alelo G, do gene *TLR9*, na posição +2848, teve frequência aumentada no grupo controle (55,50% vs 47,51%, $p=0,0353$; $OR=0,72$; $IC=0,54-0,97$). Por outro lado, o alelo A apresentou-se com uma frequência aumentada no grupo dos pacientes, sugerindo um risco ao desenvolvimento da hanseníase ($p=0,0353$; $OR=1,38$; $IC=1,03-1,84$).

Tabela 1. Frequências dos alelos do gene *TLR4*, posição 3192, em pacientes com hanseníase e grupo controle.

SNP	Grupo dos pacientes (N=107)	F(%)	Grupo dos controles (N=166)	F(%)	P	OR	IC
C	148	69,16 %	281	84,64%	0,0001	0,41	0,27-0,62
A	66	30,84 %	51	15,36%	0,0001	2,46	1,62-3,72

SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; P: significativo <0,05; OR: odds ratio; 95% IC: intervalo de confiança.

Tabela 2. Frequências dos alelos do gene *TLR9*, em pacientes com hanseníase e grupo controle.

SNP	Grupo dos pacientes (N=181)	F(%)	Grupo dos controles (N=191)	F(%)	P	OR	IC
G	172	47,51 %	212	55,50%	0,0353	0,72	0,54-0,97
A	190	52,49 %	170	44,50%	0,0353	1,38	1,03-1,84



SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; P: significativo <0,05; OR: odds ratio; 95% IC: intervalo de confiança.

Conclusões

Considerando que a hanseníase é uma doença multifatorial complexa, pois o desenvolvimento da infecção, após o contato com o bacilo, está sob o controle de fatores físicos e ambientais, além de fatores genéticos do hospedeiro; essa pesquisa contribuiu para comprovar a participação dos receptores *Toll-like* na interação do bacilo com as células do hospedeiro, durante o desenvolvimento da resposta imune. É necessário, dessa forma, a realização de mais estudos com um número maior de marcadores genéticos da hanseníase para definir um perfil genético de risco característico desta patologia.

Agradecimentos

Agradecimentos à Fundação Araucária, ao Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM) e ao Centro de Especialidades do SUS-MS pelo apoio na realização desse projeto.

Referências

CARDOZO, D.M.; GUELSIN, G.A.; CLEMENTINO, S.L.; MELO, F.C.; BRAGA, M.A.; SOUZA, C.; MOLITERNO, R.A.; VISENTAINER, J.E.L. DNA extraction from coagulated human blood for application in genotyping techniques for human leukocyte antigen and immunoglobulin-like receptors. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2009, 42, 651–656.

JOHNSON, C.M.; LYLE, E.A.; OMUETI, K.O. Cutting Edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **J. Immunol.** 2007, 178, 7520-7524.

KRUTZIK, S.R.; OCHOA, M.T.; SIELING, P.A.; UEMATSU, S.; NG, Y.W.; LEGASPI, A.; LIU, P.T.; COLE, S.T.; GODOWSKI, P.J.; MAEDA, Y.; SARNO, E.N.; NORGARD, M.V.; BRENNAN, P.J. AKIRA, S.; REA, T.H.; MODLIN, R.L. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat. Med.** 2003, 9, 525-532.

MODLIN, R.L. The innate immune response in leprosy. **Cur. Op. Immun.** 2009, 22, 48-54.