



ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS GENES TLR EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM A DOENÇA.

Larissa Pires Mueller (PIBIC/CNPq/Uem), Talita Aparecida Tódora, Amarilis Giaretta de Moraes, Pâmela Guimarães Reis, Karina Mayumi Sakita, Camila de Freitas Oliveira, Márcia Machado de Oliveira Dalalio (Orientadora), e-mail: mmodalalio@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas – Imunologia - Imunogenética.

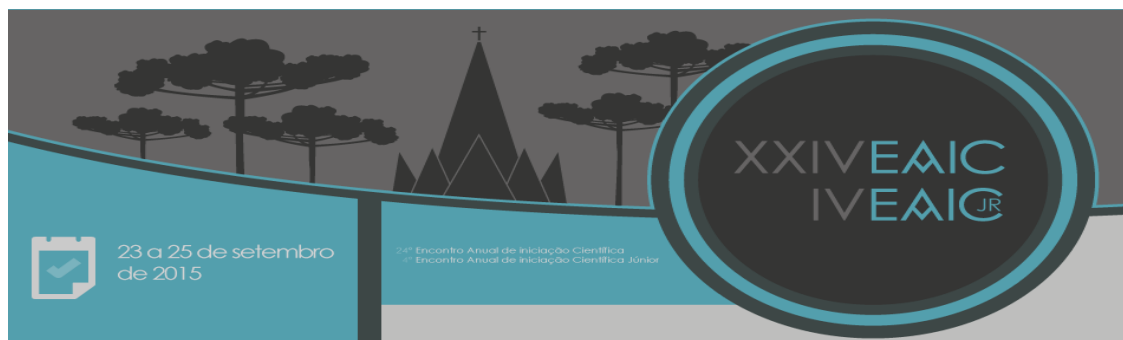
Palavras-chave: Receptores *Toll-like*, Associação com doença, polimorfismo.

Resumo

A doença de chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, responsável por ativar o sistema imunológico. A interação do *T. cruzi* com células da imunidade inata é mediada por receptores específicos como os Toll-like (TLR- Toll-Like Receptors). O intuito deste estudo foi analisar a associação do polimorfismo dos genes TLRs na susceptibilidade e/ou resistência à doença de Chagas em sua fase crônica. Para isso foi feita a comparação entre as frequências dos genes Toll-like de indivíduos saudáveis não infectados e pacientes com doença de Chagas crônica. A genotipagem dos *TLRs* 2, 4 e 9, principais genes relacionados com a doença, foi realizada pela técnica de PCR-SSP. A análise de associação envolvendo pacientes com a doença de Chagas crônica e grupo controle não mostrou nenhuma diferença estatística significativa. Embora os resultados obtidos até o momento não nos permitam avaliar uma associação dos genes Toll-like com a doença de Chagas, estudos relacionados evidenciam que a genética da susceptibilidade da doença de Chagas e a cardiopatia chagásica crônica são altamente influenciadas pela complexa resposta imune do hospedeiro.

Introdução

A Doença de Chagas é frequente nas Américas e suas formas de transmissões são a vetorial, congênita, por transfusão de sangue ou pela



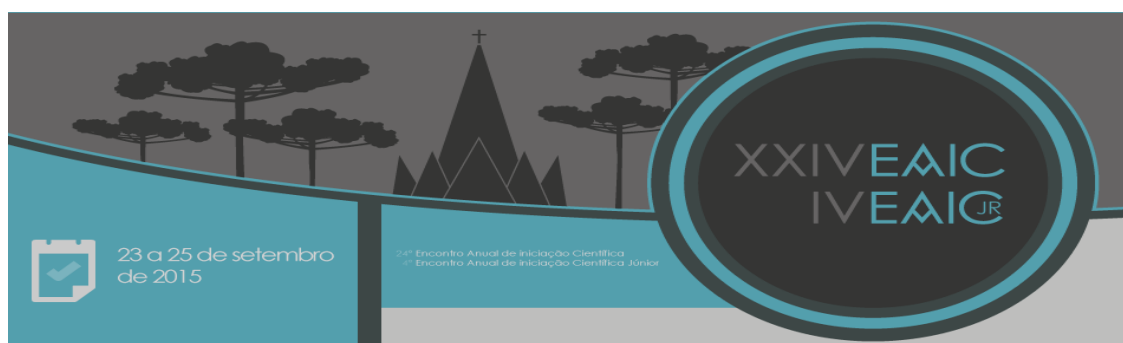
ingestão de alimentos contaminados com o *Trypanosoma cruzi*. O diagnóstico é realizado por meio de testes sorológicos e/ou parasitológicos (JUNIOR, 2006). A doença é caracterizada por uma curta fase aguda, seguida de uma longa fase crônica, na qual entre 30 - 40% dos infectados tem ou terão o desenvolvimento de cardiomiopatia, e/ou síndromes digestivas. O principal fator clínico na manifestação cardíaca é a insuficiência cardíaca congestiva, devido à diminuição da massa muscular que se encontra destruída (RASSI et al, 2010). Uma combinação de fatores genéticos e ambientais relacionados ao parasito e ao hospedeiro podem ser responsáveis pela variação no curso clínico da doença (MACEDO et al, 2004). A infecção com o *T. cruzi* pode ativar múltiplas vias do sistema imunológico do hospedeiro. A interação do *T. cruzi* com macrófagos e outras células envolvidas na resposta imune inata é mediada por receptores específicos de reconhecimento de padrões do patógeno, como os receptores *Toll-like* (*TLRs*). Estes receptores são ativados por moléculas presentes na superfície do patógeno que induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Os *TLRs* são expressos pelas células do sistema imune inato, e estão entre os primeiros receptores a atuarem promovendo a ativação da célula contra agentes infecciosos. Os principais *TLRs* envolvidos na doença de Chagas são: *TLR 2*, *4* e *9* (ASHOUR, 2015). Nessa perspectiva, esse estudo teve como objetivo investigar a associação do polimorfismo dos genes *TLRs 2*, *4* e *9* na susceptibilidade e/ou resistência à doença de Chagas crônica da região norte/noroeste do Paraná.

Materiais e métodos

Foram selecionados pacientes portadores da doença de Chagas crônica, atendidos pelo SUS através do Laboratório de Chagas da Universidade Estadual de Maringá e do Hospital Universitário de Londrina. O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis e não relacionados. Para a extração do DNA, foi utilizada a técnica de *salting out*. Os genes *Toll-Like* foram genotipados pela técnica PCR-SSP (*polymerase chain reaction - sequence-specific*). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados através de eletroforese em gel de agarose e fotodocumentados. As análises estatísticas foram executadas utilizando o programa SNPstats e os polimorfismos genéticos calculados pelo método *Odss ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) 95%, calculado pelo método de Woolf.

Resultados e Discussão

A análise de associação (**Tabela 1**) envolvendo pacientes com a doença de Chagas crônica e grupo controle não mostrou nenhuma diferença



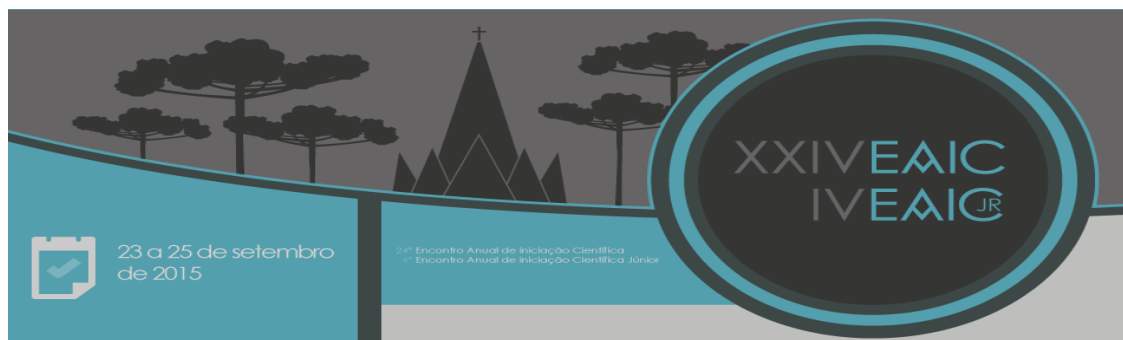
estatística significativa ($P < 0,05$) em relação aos polimorfismos de TLR estudados.

Tabela 1 Análise de Associação do gene *Toll-like* 2, 4 e 9 em pacientes com doença de Chagas e controles.

TLR (SNP)	Pacientes	Controles	OR (IC 95%)	P-valor
TLR 2 (14536)				
Genótipos	N=20 n(%)	N=24 n(%)		
T/C	10 (50)	10 (41,7)	0,83 (0,25-2,80)	0,27
T/T	10 (50)	12 (50)	1,00	
TLR 2 (1410)				
Genótipos	N=23 n(%)	N=21 n(%)		
T/C	20 (87)	16 (76,2)	0,60 (0,12-3,80)	0,38
T/T	3 (13)	4 (19,1)	1,00	
TLR 2 (Códon 677)				
Genótipos	N=14 n(%)	N=15 n(%)		
C/C	3 (21,4)	0 (0)	1,00	0,053
TLR 4 (Códon 299)				
Genótipos	N=17 n(%)	N=20 n(%)		
A/A	0 (0)	1 (5)	1,00	0,25
TLR 4 (Int 1)				
Genótipos	N=07 n(%)	N=07 n(%)		
C/C	6 (85,7)	3 (42,9)	1,00	0,075
T/T	1(14,3)	1 (14,3)	2.00 (0,09-44,35)	
TLR 4 (Int 2)				
Genótipos	N=15 n(%)	N=23 n(%)		
A/A	14 (93,3)	22 (95,7)	1,00	0,076
A/C	1 (6,7)	1 (4,3)	0,64 (0,04-11,02)	
TLR 9 (+2848)				
Genótipos	N=21 n(%)	N=16 n(%)		
G/A	17 (81)	11 (68,8)	0,39 (0,08-1,96)	0,29
G/G	3 (14,3)	5 (31,2)	1,00	

N, número de indivíduos; n, número de genótipos ou alelos; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança

Os resultados obtidos até o momento não corroboram os encontrados na literatura. Diversos estudos têm reportado muitos marcadores genéticos de susceptibilidade e/ou proteção contra a doença de Chagas, dentre eles, estão os genes *TLRs*, que também podem estar determinando o desenvolvimento das formas clínicas cardíaca, digestiva ou mista. Em um estudo utilizando camundongos, foi verificado que o *TLR 2* e a síntese de Interleucina-6 estão associados à proteção das fibras musculares cardíacas



contra a apoptose durante a infecção por *T. cruzi* (Ponce *et al.*, 2011). Apesar de vários autores já terem encontrado associação entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento da doença de Chagas, nossos resultados não mostraram nenhuma diferença significativa quando comparamos pacientes e controles saudáveis. Isto pode ser devido ao fato de que o tamanho da amostra analisada ainda é pequeno, uma vez que nosso trabalho está em andamento e será concluído com uma amostra de pelo menos 100 pacientes e 150 controles.

Conclusões

Embora os resultados obtidos até o momento não nos permitam avaliar uma associação dos genes Toll-like com a doença de Chagas, estudos relacionados evidenciam que a genética da susceptibilidade da doença de Chagas e a cardiopatia chagásica crônica são altamente influenciadas pela complexa resposta imune do hospedeiro.

Agradecimentos

Ao CNPq, à CAPES, à Fundação Araucária e ao Laboratório de imunogenética da UEM. Pelo incentivo científico e financeiro cedido a nossa pesquisa.

Referências

ASHOUR, D. S. **Toll-like receptor signaling in parasitic infections**. Expert Rev. Clin. Immunol.1-10, 2015.

JUNQUEIRA, Junior LF. **Ecos da XXII reunião anual de pesquisa aplicada em doença de Chagas e X reunião anual de pesquisa aplicada em leishmanioses**. Rev Soc Bras Med Trop. 39:565-6, 2006.

MACEDO AM, Machado CR. Oliveira RP. Pena SD. ***Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99:1-12, 2004.

PONCE, N. E. Cano, R. C. Carrera-Silva, E. A. Lima, A. P. Gea, S. Aoki, M. P. **Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection**. Med Microbiol Immunol.201:145–155, 2012.

RASSI Jr, A. **Chagas disease**. *Lancet* 2010, 375, 1388.