



ESTUDO DAS FREQUÊNCIAS DOS GENES TOLL-LIKE NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Talita Aparecida Todora, Larissa Pires Mueller, Amarilis Giaretta de Moraes, Pâmela Guimarães Reis, Karina Mayumi Sakita, Camila de Freitas Oliveira, Jeane Eliete Laguila Visentainer, Márcia Machado de Oliveira Dalalio (Orientadora), e-mail: mmodalalio@hotmail.com

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

Ciências Biológicas – Imunologia - Imunogenética.

Palavras-chave: Receptores Toll-Like, Doença de Chagas, Polimorfismo genético.

Resumo:

A doença de Chagas é uma antropozoonose parasitária, causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Ela é transmitida ao homem quando o inseto vetor deposita, juntamente com suas fezes, a forma infectante do parasito na pele lesionada do indivíduo, após o repasto sanguíneo. A resposta imune inata é a primeira via de defesa contra o parasito, onde os receptores específicos de reconhecimento de padrões do patógeno, como os receptores Toll-like (TLR - Toll-Like Receptors), irão reconhecer os antígenos iniciando a resposta do hospedeiro. O Objetivo deste trabalho foi analisar a frequência dos polimorfismos dos genes *TLRs* em pacientes com a doença de Chagas crônica numa população da região norte/noroeste do Paraná. Para isso, foram realizadas as genotipagens dos *TLRs* 2, 4 e 9 por PCR-SSP. Em resumo, em relação aos polimorfismos do gene *TLR*, foi possível identificar que os alelos mais frequentes foram T, C e G, enquanto que os genótipos mais frequentes foram os heterozigotos para T/C e G/A. Estes dados foram obtidos de uma amostra cujo tamanho ainda é pequeno, uma vez que nosso trabalho está em andamento e será concluído com uma amostra de pelo menos 150 pacientes.

Introdução

A doença de Chagas é uma antropozoonose grave e endêmica frequente nas Américas e causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*. Em humanos, a doença pode ser classificada em aguda e crônica. A maioria dos pacientes entra em uma fase crônica da doença, conhecida como assintomática, porém, 20 a 40% dos indivíduos infectados desenvolvem



manifestações clínicas decorrentes de alterações cardíacas e/ou digestivas (RASSI et al., 2010).

A infecção pelo *T. cruzi* pode ativar múltiplas vias do sistema imunológico do hospedeiro. O reconhecimento celular é mediado por receptores específicos, como os receptores Toll-like (TLRs). 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, 2007). As razões para ocorrer um variável curso clínico da doença ainda não foram esclarecidas, mas é provável que a variabilidade genética e uma combinação de fatores (ambientais, nutricionais, imunológicos, etc.) possam estar relacionadas tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, podendo ser as responsáveis pela patogênese da fase crônica da doença (MACEDO et al., 2004). Portanto, é de especial interesse a investigação de genes de resposta imune, entre eles o polimorfismo dos genes *Toll-Like* nesses pacientes, sendo que os mais relacionados com a doença de Chagas são os TLRs 2, 4 e 9 (ASHOUR, 2015). Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar a frequência do polimorfismo dos genes *TLRs* na doença de Chagas crônica numa população da região norte/noroeste do Paraná.

Materiais e métodos

Neste estudo foram utilizadas amostras de sangue de pacientes portadores da doença de Chagas crônica, atendidos pelo SUS através do Laboratório de Chagas da Universidade Estadual de Maringá e do Hospital das Clínicas de Londrina. Para a extração do DNA, foi utilizada a técnica *salting out*. As genotipagens dos genes *TLRs* foram realizadas pela técnica PCR-SSP (*polymerase chain reaction - sequence specific*) e os fragmentos de DNA analisados em gel de agarose e fotodocumentados. As análises estatísticas foram executadas utilizando o programa SNPstats.

Resultados e Discussão

Nesse estudo foram analisadas as frequências alélicas e genóticas de indivíduos diagnosticados com a doença de Chagas para as variantes do gene *Toll-like* 2, 4 e 9 (tabela 1). As diferenças no número de pacientes analisados para os diferentes SNP (Single Nucleotide Polymorphism) se devem a falhas nas genotipagens. Dessa forma, foi possível observar que os alelos T, C e G foram os mais frequentes. Assim, as variantes do TLR 2 (14536) e TLR 2 (1410) , com 75% e 57%, respectivamente, têm o alelo T com maior ocorrência. O alelo C está mais frequente nos TLR 2 (códon 677) e TLR 4 (Int 1), com 61% e 86% respectivamente, enquanto que para o alelo G, a maior ocorrência foi de 53% e 55%, nos TLR 4 (códon 299) e TLR 9 (+2848), respectivamente. Para os genótipos, foi possível observar que a maioria dos



pacientes são heterozigotos para o genótipo T/C nos SNPs (1410) e (677) do TLR 2, com 87% e 79%, respectivamente; e para o genótipo G/A, os SNPs mais frequentes foram os presentes no TLR 4 (códon 299) e TLR 9 (+2848). Os indivíduos homozigotos, apresentaram os genótipos C/C e A/A nos SNPs do TLR 4 (Int 1) e (Int2), com 86% e 93%, respectivamente. Após realizada a pesquisa, não foi encontrado na literatura estudos realizados com a doença de Chagas para os mesmos polimorfismos analisados nesse estudo, mas foi possível observar, no estudo de Zafra et al (2008), que assim como no nosso estudo, a maioria dos indivíduos apresentam genótipos heterozigoto.

Tabela 1 Frequência de genótipos e alelos do gene *Toll-like 2, 4 e 9*.

TLR (SNP)	Pacientes	TLR (SNP)	Pacientes	TLR (SNP)	Pacientes
TLR 2 (14536)		TLR 2 (1410)		TLR 2 (Códon 677)	
Genótipos	N=20 n(%)	Genótipos	N=23 n(%)	Genótipos	N=14 n(%)
C/C	0 (0)	C/C	0 (0)	C/C	3 (21)
T/C	10 (50)	T/C	20 (87)	C/T	11 (79)
T/T	10 (50)	T/T	3 (13)	T/T	0 (0)
Alelos		Alelos		Alelos	
T	30 (75)	T	26 (57)	C	17 (61)
C	10 (25)	C	20 (43)	T	11 (39)
TLR 4 (Códon 299)		TLR 4 (Int 1)		TLR 4 (Int 2)	
Genótipos	N=17 n(%)	Genótipos	N=07 n(%)	Genótipos	N=15 n(%)
G/G	1 (6)	C/C	6 (86)	A/A	14 (93)
G/A	16 (94)	C/T	0 (0)	A/C	1 (7)
A/A	0 (0)	T/T	1(14)	Alelos	
Alelos		Alelos		A	29 (97)
G	18 (53)	C	12 (86)	C	1 (3)
A	16 (47)	T	2 (14)		
TLR 9 (+2848)					
Genótipos	N=21 n(%)				
A/A	1 (5)				
G/A	17 (81)				
G/G	3 (14)				
Alelos					
G	23 (55)				
A	19 (45)				

N: número de indivíduos; n: número de genótipos ou alelos.



Conclusões

Em resumo, em relação aos polimorfismos do gene TLR foi possível identificar que os alelos mais frequentes foram T, C e G, enquanto que os genótipos mais frequentes foram os heterozigotos para T/C e G/A. Estes dados foram obtidos de uma amostra cujo tamanho ainda é pequeno, uma vez que nosso trabalho está em andamento e será concluído com uma amostra de pelo menos 150 pacientes.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Laboratório de Imunogenética da UEM e à Fundação Araucária pelo apoio e dedicação para realização do projeto.

Referências

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

JOHNSON C. M. LYLE E. A. OMUETI K. O. et al. **Cutting Edge: A Common Polymorphism Impairs Cell Surface Trafficking and Functional Responses of TLR1 but Protects against Leprosy.** *J. Immunol.* 178 (12):7520-24; 2007.

MACEDO A. M. MACHADO C. R. OLIVEIRA R. P. PENA S. D. **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.

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

ZAFRA G. FLOREZ O. MORILLO C. A. ECHEVERRIA L. E. MARTIN J. GONZALEZ C. I. **Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in Chagas disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 103(1): 27-30; 2008.