

ESTUDO DA FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS *TNF-238* E *TNF-308* E SUA ASSOCIAÇÃO COM ESPONDILOARTROPATIAS

Gabriela Fernanda Martinez (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Luciana Conci Macedo, Marco Antonio Rocha Loures, Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientador), e-mail: jelvisentainer@gmail.com

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

Ciências Biológicas – Imunologia - Imunogenética

Palavras-chave: Polimorfismo Nucleotídeo Único, autoimunidade, Espondilite Anquilosante

Resumo:

Espondiloartropatias (EpAs) compreendem um grupo heterogêneo de doenças reumatológicas imunomediadas, etiologia desconhecida, com características clínicas sobrepostas e de predisposição genética. Realizou-se um estudo caso-controle para verificar a frequência e associação dos polimorfismos de nucleotídeos únicos do gene *TNF* em indivíduos saudáveis e pacientes com EpAs, Espondilite Anquilosante (EA) e Artrite Psoriática (AP) oriundos de populações da Região Noroeste Paranaense. Realizou-se a genotipagem de *TNF-308* e *TNF-238* em 243 pacientes com EpAs e 210 controles por meio da PCR-RFLP. Ao avaliar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos, verificamos uma maior frequência do alelo A e do genótipo GA do *TNF-238*, mas nenhuma associação significativa nas EpAs, apenas com a forma clínica da artrite Psoriática. Em relação ao *TNF-308* foi verificada uma associação significativa do alelo A e dos genótipos G/A+A/A no modelo dominante nas EpAs e EA. Foi encontrada uma associação dos polimorfismos do gene *TNF* às EpAs no geral, principalmente, à EA e AP, independentemente do gênero, não excluindo a importância de estudos futuros para confirmação dessa associação genética.

Introdução

Espondiloartropatias (EpAs) formam um grupo de doenças reumatológicas de caráter inflamatório crônico, de difícil diagnóstico clínico e de etiologia desconhecida que possuem características comuns entre si. Esse grupo inclui: Espondilite Anquilosante (EA), Artrite Psoriática (AP), Artrite Reativa (AR), artrite relacionada com a doença inflamatória intestinal e EpA indiferenciada (EI) (LIPTON e DHEODAR, 2012).

O mecanismo das EpAs e das doenças reumatológicas ainda não é totalmente compreendido, assim como sua patogênese, considerada complexa, multifatorial e atribuída à interação entre fatores genéticos e

ambientais (RUDWALEIT e HÖHLER, 2001). Polimorfismos em genes que codificam citocinas que interferem na produção de outras citocinas inflamatórias têm sido associados à essas doenças, entres eles os polimorfismos do gene do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O fator de necrose tumoral alfa é uma citocina pró-inflamatória pleitrópica produzida por macrófagos e células dendríticas que tem como tecidos alvos as células tumorais e inflamatórias que além de efeitos citotóxicos induz a secreção de citocinas e causa dano tecidual generalizado. Seus polimorfismos de nucleotídeos únicos SNPs mais estudados são o -238 G>A (rs361525) e o -308 G>A (rs1800629), onde a presença da guanina (G) define o alelo mais comum (RUDWALEIT e HÖHLER, 2001).

O objetivo do presente estudo foi verificar a frequência dos polimorfismos *TNF-238* e *TNF-308* nos pacientes com espondiloartrites e no grupo controle, oriundos de populações de indivíduos da Região Noroeste do Estado do Paraná que desenvolveram a doença.

Materiais e métodos

Nós avaliamos 243 pacientes adultos, com Espondiloartrites, de ambos os sexos, residentes em diferentes municípios do noroeste do Estado do Paraná e 210 controles que não apresentaram EpAs, doença autoimune e/ou reumática e sem grau de parentesco com indivíduos desse mesmo grupo ou com os pacientes. Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue periférico em tubos contendo anticoagulantes. O DNA foi extraído pelo método de extração *salting-out* e posteriormente, avaliado a sua concentração pelo espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific[®], Wilmington, USA). Foram avaliados os polimorfismos *TNF-238* (rs361525) e *TNF-308* (rs1800629) pelo método de RFLP após a amplificação das sequências por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e digestão das mesmas através das enzimas MsPI para o polimorfismo *TNF-238* e NcoI para o polimorfismo *TNF-308*. A frequência foi obtida por contagem direta, após organização dos dados em planilha Excel. As comparações das frequências fenotípicas destes alelos entre pacientes e controles forma realizadas por meio do teste do qui-quadrado, usando-se uma tabela de contingência 2x2 ou pelo Teste Exato de Fisher utilizando o programa SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php>).

Resultados e Discussão

As características dos pacientes e controles quanto à idade, gênero e forma clínica estão apresentados na Tabela 1. Foram analisados 243 pacientes e 210 controles.

Os polimorfismos de alelos e genótipos para *TNF-308* e *TNF-238* em pacientes e controles saudáveis são apresentados na tabela 2. A distribuição da frequência genotípica destes polimorfismos nos controles estava no equilíbrio de HW.

Ao avaliar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos apresentados na Tabela 2, verificamos uma maior frequência do alelo A e do genótipo GA do *TNF-238* dos pacientes em relação aos controles, mas não foi encontrada nenhuma associação significativa nas EpAs, apenas com a forma clínica da artrite Psoriática quando comparado ao grupo controle no modelo dominante (G/A+A/A), OR (95%IC):2.12 (1.08-4.17). Estes dados estão de acordo com Rahman et al. que realizaram uma meta-análise de todos os estudos de associação de *TNF* em populações brancas de artrite psoriática (RAHMAN, 2006).

Em relação ao *TNF-308*, foi verificada uma associação significativa do alelo A [OR (95%IC):1.56 (1.07-2.21)], e dos genótipos G/A+A/A no modelo dominante [OR (95%IC):1.72 (1.16-2.55)] nas EpA e EA [OR (95%IC):2.01 (1.31-3.06)] em relação ao grupo controle e na forma clínica AP não foi encontrada associação significativa. Os dados encontrados estão de acordo com Höhler et al. que demonstraram uma associação do genótipo *TNF-308* A/A com EA em pacientes alemães (HÖHLER et al, 2002).

Tabela 1. Características iniciais dos pacientes e voluntários saudáveis (controles)

Dados	EpA n=243 (%)	EA n=174 (%)	AP n=67(%)	Controles n=210 (%)
Idade média (dp) anos	47 (±15,7)	45 (±15,3)	51 (±16,1)	40 (±2,7)
Gênero, masculino (%)	109 (44,9)	81 (46,6)	28 (41,8)	92 (43,8)
Gênero, feminino (%)	134 (55,2)	93 (53,6)	39 (58,2)	118 (56,2)

Abreviações: EpA, Espondiloartrite; EA, Espondilite Anquilosante; AP, artrite psoriática.

Tabela 2. Frequências de genótipos e alelos de *TNF-238*, *TNF-308*, em pacientes com EpA, EA, AP e em controles

Gene (SNP)	Alelos Genótipos	EpA n=243	EA n=173	AP n=67	Controles n=210
<i>TNF-238</i> (rs361525)	G	440 (90,5)	319 (92,2)	116 (86,6)	390 (92,9)
	A	46 (9,5)	27 (7,8)	18 (13,4)	30 (7,1)
	G/G	198 (81,5)	146 (84,4)	50 (74,6)	181 (86,2)
	G/A	44 (18,1)	27 (15,6)	16 (23,9)	28 (13,3)
	A/A	1 (0,4)	0 (0)	1 (1,5)	1 (0,5)
<i>TNF-308</i> (rs1800629)	G	383 (78,8)	266 (76,9)	111 (82,8)	358 (85,2)
	A	103 (21,2)	80 (23,1)	23 (17,2)	62 (14,8)
	G/G	144 (59,3)	96 (55,5)	45 (67,2)	150 (71,4)
	G/A	95 (39,1)	74 (42,8)	21 (31,3)	58 (27,6)
	A/A	4 (1,6)	3 (1,7)	1 (1,5)	2 (1,0)

EpA, Espondiloartrite; EA, Espondilite Anquilosante; AP, artrite psoriática.

Conclusões

Dessa maneira, concluiu-se que nessa população brasileira mista, o polimorfismo do gene *TNF-308* foi associado com EpAs e EA, enquanto que o polimorfismo do gene *TNF-238* foi associado com AP. A elucidação do papel desses marcadores biológicos em conjunto com outros fatores, no desenvolvimento das EpAs, deve ser investigada em outras populações, para compreendermos melhor a imunofisiopatologia das EpAs, assim como, para o desenvolvimento de novas terapias.

Agradecimentos

Ao CNPq, CAPES, Fundação Araucária e Laboratório de Imunogenética da UEM. Pelo incentivo científico e financeiro cedido à pesquisa.

Referências

HÖHLER, T. et al. Differential association of polymorphisms in the *TNF α* region with psoriatic arthritis but not psoriasis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 61, n. 3, p. 213-218, 2002.

LIPTON, S.; DEODHAR, A. The new ASAS classification criteria for axial and peripheral spondyloarthritis: promises and pitfalls. **International Journal of Clinical Rheumatology**, v. 7, n. 6, p. 675-682, 2012.

RAHMAN, P. et al. *TNF α* polymorphisms and risk of psoriatic arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 65, n. 7, p. 919-923, 2006.

RUDWALEIT, M.; HÖHLER, T. Cytokine gene polymorphisms relevant for the spondyloarthropathies. **Current opinion in rheumatology**, v. 13, n. 4, p. 250-254, 2001.