

## ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE *TLR4* COM A DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA.

Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Ana Maria Sell (orientadora), Joana Maira Valentin Zacarias (pesquisadora), e-mail: [amsell@uem.br](mailto:amsell@uem.br).

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

**Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas – Imunologia/Imunogenética.**

**Palavras-chave:** Periodontite Crônica, Receptores Toll-Like, Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

### Resumo

A doença periodontal crônica (DPC) é uma doença polimicrobiana multifatorial. DPC é causada por estímulos de bactérias Gram-negativas que se acumulam no sulco gengival e tem uma propagação intimamente ligada à resposta imunoinflamatória do hospedeiro. Receptores semelhantes à Toll (TLRs) são proteínas de membranas que funcionam como mediadores-chave da imunidade inata. O objetivo desse estudo foi avaliar a possível influência dos polimorfismos de nucleotídeo único de receptores Toll-like 4 (*TLR4*) e o desenvolvimento da doença periodontal crônica. Estudo caso-controle foi conduzido com 50 pacientes com DPC e controles. Os genótipos de *TLR4* foram determinados por PCR-RFLP. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas OpenEpi e SNPStats. Não houve diferença significativa ao se comparar os alelos e genótipos dos polimorfismos de *TLR4* entre pacientes e controles. Porém, houve tendência ao risco em desenvolver a DPC em pacientes com o genótipo AG *TLR4* 896A/G (Asp299Gly) e um risco de duas vezes em desenvolver a DPC em pacientes do sexo masculino com os haplótipos raros GC ou AT.

### Introdução

A doença periodontal crônica (DPC) é polimicrobiana, multifatorial e causada por estímulos de bactérias Gram-negativas que se acumulam no sulco gengival. DPC tem uma propagação intimamente ligada à resposta imunoinflamatória do hospedeiro. O processo inflamatório na DPC é um dos fatores responsáveis pelo dano tecidual, resultando na formação de bolsa periodontal e destruição do ligamento periodontal e suporte do tecido ósseo adjacente e consequente perda dos dentes (SUSIN *et al.*, 2005).

Receptores semelhantes à Toll (*Toll-like Receptors* – TLRs) são proteínas de membranas que funcionam como mediadores-chave de imunidade inata.

Estes receptores se ligam a diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a produtos endógenos induzidos por lesão e, a partir daí, ocorre o envio de sinais intracitoplasmáticos para a ativação celular. Desta forma, TLR é crucial na ativação da cascata molecular inflamatória. TLR4 estão presentes e expressos principalmente nas células endoteliais, macrófagos e células epiteliais de vias aéreas (ZAREMBER *et al.*, 2002).

Arbour *et al.* (2000) demonstraram que as mutações comuns em *TLR4* estão associadas com diferenças na resposta a lipopolissacarídeos (LPS) e sugeriram que as alterações de sequências nos genes podem alterar a capacidade do hospedeiro em responder ao estresse ambiental. As mutações Asp299Gly (rs4986790 896A/G) e Thr399Ile (rs4986791 1196C/T) no gene *TLR4* afetam o domínio extracelular da proteína. Ambas levam a acentuada eficácia de resposta à sinalização ao LPS e reduzem a capacidade de induzir a inflamação.

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos de nucleotídeo único de *TLR4* nas posições Asp299Gly e Thr399Ile na patogenia da doença periodontal crônica.

## Materiais e métodos

Um total de 150 indivíduos foi selecionado para participar deste estudo. Pacientes com DPC (N=50) e controles (N=100) foram avaliados e selecionados nas Clínicas Odontológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e do Centro Universitário Ingá, ambas localizadas na cidade de Maringá-PR. Os seguintes critérios de seleção foram considerados:

**Critérios de Inclusão:** idade entre 30 e 65 anos; arcada dentária com no mínimo 20 dentes; pacientes com DPC com pelo menos cinco sítios em diferentes dentes, presença de bolsa periodontal  $\geq 5$  mm e perda de inserção  $\geq 3$  mm; controles apresentaram menos que 30% de sangramento à sondagem e nenhuma bolsa periodontal  $>4$  mm.

**Critérios de Exclusão:** indivíduos com doença periodontal agressiva, infecção aguda, diabetes ou que fizeram tratamento periodontal nos últimos seis meses; indivíduos do grupo controles não poderiam ter apresentado nenhum quadro de doença periodontal anteriormente.

De cada indivíduo, cerca de 10 ml de sangue periférico foram coletados em tubo contendo EDTA e a extração de DNA foi realizada pelo método de *salting out*. As genotipagens dos polimorfismos de *TLR* foram realizadas por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de acordo com Folwaczny *et al.* (2004).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas OpenEpi e SNPStats para os cálculos de qui-quadrado, *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% e equilíbrio de Hardy-Weinberg. Considerou-se o valor de  $p \leq 0,05$  com significância estatística.

## Resultados e Discussão

Os polimorfismos de *TLR4* Asp299Gly e *TLR4* Thr399Ile foram analisados em 50 pacientes com DPC e 100 controles pareados quanto a sexo e idade. A média de idade no grupo dos pacientes foi de 47,52 ±9,94 e do grupo controle 46,91 ±9,02. A distribuição dos genótipos dos SNP analisados encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Comparando-se as frequências alélicas e genóticas entre os pacientes com DPC e grupo controle para os polimorfismos de *TLR4* Asp299Gly e *TLR4* Thr399Ile não foram observadas diferenças estatísticas (tabela 1). No entanto, a frequência genotípica de AG *TLR4* (896A/G, Asp299Gly) foi aumentada em pacientes (18% vs 8%,  $P = 0,06$ ) evidenciando tendência ao desenvolvimento da DPC.

Tabela 1: Distribuição das frequências dos alelos e genótipos, comparando os grupos de pacientes com doença periodontal crônica e controles.

		Pacientes DPC N= 50	Controle N= 100	
		n (%)	n (%)	P
<i>TLR</i> Asp299Gly				
Alelos	A	91 (91,0)	192 (96,0)	0,13
	G	9 (9,0)	8 (4,0)	
Genótipos	AA	41 (82,0)	92 (92,0)	0,06
	AG	9 (18,0)	8 (8,0)	
<i>TLR</i> Thr399Ile				
Alelos	C	92 (92,0)	192 (96,0)	0,23
	T	8 (8,0)	8 (4,0)	
Genótipos	CC	42 (84,0)	92 (92,0)	0,14
	CT	8 (16,0)	8 (8,0)	

n=número; P=p-valor

As frequências genóticas e alélicas de pacientes e controles foram analisadas separadamente dentro dos gêneros e diferenças significativas não foram observadas.

Folwaczny *et al.* (2004) não observaram associação entre os polimorfismos de *TLR4* e a DPC, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Tabela 2: Distribuição da frequência dos haplótipos em pacientes com doença periodontal crônica e controles, estratificados por gênero.

Haplótipos	Frequência	Feminino	Masculino
		OR (IC=95%)	OR (IC=95%)
AC	0,94	1	0,73 (0,35 - 1,56)
GT	0,05	1	0,74 (0,10 - 5,74)
Raro*	0,01	1	2,22 (1,05 - 4,71)

\*Haplótipos raros: GC e AT

Ao avaliar os haplótipos formados, observou-se um risco de duas vezes (OR=2,22; IC 95%: 1,05 – 4,71) no desenvolvimento da DPC em indivíduos do sexo masculino com os haplótipos raros (GC ou AT). Isso sugere uma possível associação dos polimorfismos de *TLR4* e a DPC (tabela 2). No entanto, perde importância por serem raros. Outro dado observado foi que os polimorfismos de *TLR4* estão em desequilíbrio de ligação ( $D' = 0,93$ ).

## Conclusões

Associação entre os polimorfismos e *TLR4* e DPC não foram observados. No entanto, tendência no polimorfismo de *TLR4* 896 (Asp299Gly) e dos genótipos raros em ambos SNPS foi constada. Estudos adicionais são necessários para compreender o papel destes polimorfismos na patogênese da DPC.

## Agradecimentos

Ao CNPq, à CAPES, à Fundação Araucária e ao Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG – UEM) pelo incentivo científico e financeiro. À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade de fazer o curso e ao LIG – UEM por me conceder a possibilidade de desenvolver a pesquisa. Aos pacientes que contribuíram para o desenvolvimento do estudo.

## Referências

- ARBOUR NC, et al. *TLR4* mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nat Genet.**, v. 25, n. 2, p.187–91, 2000.
- ERRIDGE C., STEWART J., POXTON I. R. Monocytes Heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile Mutations in the Toll-like Receptor 4 Gene Show No Deficit in Lipopolysaccharide Signaling. **J Exp Med.**, v., 197, n. 12, p. 1787–1791, 2003.
- FOLWACZNY M, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. **Clin Exp Immunol.**, .v. 135, n. 2, p. 330–335, 2004.
- SUSIN C, et al. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. **J Clin Periodontol.**, v.32, n.2, p.123–9, 2005.
- ZAREMBER KA, GODOWSKI PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. **J Immunol.**, v.168, p. 554–61, 2002.