

## ANÁLISE DO POLIMORFISMO RS121917864 DO GENE *TLR2* EM UM ESTUDO CASO CONTROLE NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ

Talita Aparecida Todora, Camila de Freitas Oliveira, Luciana Conci, Marco Antônio Araújo da Rocha-Loures, Janisleya Silva Ferreira Neve, 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:** Espondiloartrites, Receptor Toll-Like, Polimorfismo genético.

#### Resumo:

As espondiloartrites (EpA) é um grupo de doenças reumáticas inflamatórias, de origem imunológica. Muitos genes podem estar envolvidos no processo de autoimunidade dessas doenças. Os receptores *Toll-Like* (TLRs) têm um papel importante no mecanismo da imunidade inata e suas variantes genéticas podem influenciar as respostas inflamatórias. Assim, este estudo caso controle teve como objetivo analisar a influência do SNP do gene *TLR2* na imunopatogênese da EpA em indivíduos da região norte do Paraná. O polimorfismo genotipado por PCR-RFLP foi o *TLR2* rs121917864. Os resultados sugerem que o genótipo C/T obteve significância estatística e mostrou um caráter de resistência para os grupos étnicos mestiços (OR=0,27; IC=0,12–0,61), e negros (OR=0,10; IC=0,10–0,72). Sugerem também que o genótipo T/T pode estar associado à susceptibilidade de EpA na forma clínica AP (OR=14,59). Assim, o polimorfismo do gene *Toll-Like* analisado (*TLR2* 677) pode contribuir para o desenvolvimento e/ou resistência das espondiloartrites.

#### Introdução

Espondiloartrites (EpA) consiste em um grupo de doenças reumáticas de origem imunológica, que apresentam inflamações crônicas, cuja etiologia é desconhecida. O grupo é composto pelas patologias: Espondilite Anquilosante (EA), Artrite Psoriásica (AP), Artrite Reativa (ARe), Artrite associada com doenças inflamatórias intestinais, Espondiloartrite indiferenciada (EI) e Artrite Reumatóide (AR) (SIEPER *et al.*, 2006). Segundo evidências, os receptores de reconhecimento de padrões (PRR) parecem estar envolvidos no processo de autoimunidade de doenças reumáticas (SIEPER *et al.*, 2006). Dentre os PRR, os receptores *Toll-Like* (*TLR*) são os mais estudados. Embora a principal função dos *TLRs* seja

reconhecer ligantes exógenos, chamados de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), estudos recentes relatam a participação deles no reconhecimento de ligantes endógenos, os DAMPs (padrões moleculares associados ao dano) que são liberados durante danos teciduais, infecções e necrose celular, facilitando a reparação dos tecidos danificados. Entretanto, uma falha na interação entre *TLRs* e DAMPs pode auxiliar o processo inflamatório envolvido em doenças reumáticas (JOOSTEN *et al.*, 2016).

Ainda não há dados suficientes para afirmar que mutações, como o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) nos genes dos *TLRs*, estão diretamente envolvidas com doenças autoimune, como as EpA. No entanto, alguns dados experimentais sugerem o envolvimento de SNPs de *TLR* na patogênese da artrite (DREXLE e FOXWELL, 2010).

Portanto, para melhor compreensão da imunopatologia deste grupo de doenças inflamatórias, considerando os indícios de que receptores *Toll-like*, como o *TLR2*, possam estar envolvidos no processo inflamatório e na autoimunidade de doenças reumáticas, o objetivo deste estudo foi analisar a influência do polimorfismo rs121917864 do gene *TLR2*, nos pacientes com espondiloartrites e em indivíduos saudáveis, oriundos da região Norte do Estado do Paraná.

## Materiais e métodos

Neste estudo foram utilizadas amostras de sangue de pacientes adultos, que apresentaram uma das duas formas clínicas de espondiloartrites mais frequentes na população (EA ou AP), triados de clínicas de reumatologia particular e pelo ambulatório de reumatologia do Hospital Universitário de Maringá (UEM). O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis e não relacionados, provenientes da mesma área geográfica dos pacientes e com sorologia negativa para EpA. Para extração do DNA foi utilizado a técnica *in house* do *salting-out*. A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP (Reação em cadeia de polimerase - Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição) e os resultados foram visualizado num gel de agarose a 3,0%. A análise das frequências alélicas e genotípicas, o OR (Odds ratio), Intervalo de confiança (95%), valores de p e o cálculo do equilíbrio de Hardy – Weinberg foram realizados por meio do software estatístico SNPStats. Para auxiliar na análise, foi realizado o teste do qui-quadrado, através do software OpenEpi.

## Resultados e Discussão

As frequências genotípicas e alélicas do SNP analisado (rs121917864) estão em equilíbrio de Hardy - Weinberg. Os pacientes apresentaram duas formas clínicas de EpA: EA com 94 pacientes (62,7%) e AP com 55 indivíduos (36,7%). Os pacientes com EpA apresentaram média de idade de  $48,4 \pm 15,7$  anos e os controles  $49,7 \pm 15,5$  anos. Quanto ao gênero para pacientes e controles, 52% dos indivíduos são do sexo feminino e 48% do sexo masculino. Para os grupos étnicos analisados, o grupo de

brancos apresentou maior frequência em ambos os grupos, 92% nos pacientes e 82% nos controles, seguido do grupo de mestiços com 5,2% em pacientes e 13,4% nos controles, e do grupo de negros com 2% em pacientes e 4,4% em controles.

A distribuição alélica e genotípica para os grupos estudados constam na Tabela 1.

**Tabela 1. Distribuição alélica e genotípica para o gene *TLR2* 677 (rs121917864) C>T entre os grupos de controles e pacientes e suas formas clínicas.**

	CONTROLES		PACIENTES(%)				
	n=382	Todos n=150	OR (95%IC) <sup>a</sup>	EA(%) n=94	OR (95%IC) <sup>a,b</sup>	AP(%) n=55	OR (95%IC) <sup>a,c</sup>
<b><i>TLR2</i> – 677</b>							
<b>Genótipo n(%)</b>							
C/C	16 (4)	5 (3)		3 (3)		1 (2)	
C/T	365(96)	144 (96)		91 (97)		52 (95)	
T/T	1 (0,2)	2 (0,7)		-		2 (3)	14,59 (1,09–4,36)
<b>Alelo n(%)</b>							
C	199 (52)	77 (51)		49 (52)		27 (49)	
T	182 (48)	73 (49)		45 (48)		28 (51)	

EA: Espondilite Anquilosantes; AP: Artrite Psoriásica; <sup>a</sup> Controles vs Pacientes; <sup>b</sup>EA vs Controles; <sup>c</sup>AP vs Controles; \*OR: odds ratio; IC: Intervalo de confiança com  $p < 0,05$ , calculados pelo teste qui-quadrado

As variáveis analisadas no teste de regressão logística foram etnia, gênero e idade entre grupos de controles e pacientes. Esse teste apresentou significância estatística para o SNP estudado.

Na análise genotípica, o genótipo C/T foi o mais frequente nos grupos estudados (96%). Em contrapartida, o genótipo T/T apresentou a menor frequência em pacientes e controles. Na forma clínica EA, não foi possível observar o genótipo T/T. Quanto a análise da frequência alélica, pode ser observado que os alelos C e T estão proporcionalmente distribuídos na população estudada, com aproximadamente 51,5% dos indivíduos apresentando o alelo C e 48,5% o alelo T.

Os *TLRs*, ao reconhecerem moléculas específicas, induzem a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que são proteínas ativadoras do processo inflamatório. A ativação dos *TLRs* também gera uma regulação de moléculas coestimulatórias através de células apresentadoras de antígenos, podendo ocasionar o início da resposta imune adaptativa (BRENTANO *et al.*, 2005; DREXLE e FOXWELL, 2010). Segundo estudos realizados em animais, a artrite pode ser iniciada em indivíduos susceptíveis, a partir da disponibilidade de ligantes de *TLR* (DREXLE e FOXWELL, 2010). Dados sugerem, que o *TLR2* pode ser ativado por células necróticas, presentes em abundância nos tecidos artríticos, através de ligantes até o momento desconhecidos (SKARE *et al.*, 2012)

Para a mutação no *TLR2* 677, o genótipo C/T obteve significância estatística e mostrou um caráter de resistência para os grupos étnicos mestiços (OR=0,27; IC=0,12–0,61), e negros (OR=0,10; IC=0,10–0,72), entretanto a ocorrência de homozigotos mutados (T/T) pode estar envolvido na

suscetibilidade da doença na forma clínica AP (OR=14,59), uma vez que T/T esteve presente em 3% dos indivíduos com AP e o alelo T apresenta frequência muito baixa em diversas populações, sendo geralmente menor que 1%, segundo a database de SNPs do NCBI.

## Conclusões

Em resumo, nosso estudo sugere que o polimorfismo do gene *TLR2* 677 parece estar envolvido no desenvolvimento e/ou resistência das espondiloartrites. No entanto, são necessários mais estudos para compreender melhor a influência da imunogenética destes polimorfismos no desenvolvimento de EpA.

## Agradecimentos

Ao LIG-UEM, à Fundação Araucária (FA) e ao Núcleo de Diagnóstico de Maringá pelo apoio e dedicação para realização do projeto.

## Referências

BRENTANO, F. *et al.* The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. **Cell Immunol**, v. 233, n. 2, p. 90-96, 2005

SKARE, T. *et al.* Ethnic Influence in Clinical and Functional Measures of Brazil Patients with Spondyloarthritis. **J Rheumatol**, v. 39, p. 141-147, 2012

DREXLE, S.K.; FOXWELL, B.M. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 4, p. 506-518, 2010.

JOOSTEN, L.A. *et al.* Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 6, p. 344-57, 2016.

SIEPER, J. *et al.* Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. **Best Practice Res Clin Rheumatology**, v. 20, p.401-417, 2006.